

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

**Impacto de la haploinsuficiencia de CD3 en la expresión y función del
complejo TCR/CD3 en humanos y ratones**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Verónica Pérez Flores

Director

Edgar Fernández Malavé

Madrid, 2016

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



Impacto de la haploinsuficiencia de CD3 en la
expresión y función del complejo TCR/CD3 en
humanos y ratones

TESIS DOCTORAL

Verónica Pérez Flores

Madrid, 2015

TESIS DOCTORAL

Impacto de la haploinsuficiencia de CD3 en la
expresión y función del complejo TCR/CD3
en humanos y ratones

Esta memoria ha sido presentada por la Licenciada en Biología
Doña Verónica Pérez Flores para optar al grado de Doctor por el
programa de Doctorado de Inmunología (RD 778/98).

DIRECTOR DE LA TESIS

Dr. Edgar Fernández Malavé

Dpto. Microbiología I (Área de Inmunología)
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología I
(Área de Inmunología) de la UCM, con el apoyo de una beca del
programa de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio
de Educación, Cultura y Deporte (FPU-2005), y de los proyectos de
investigación FIS PI08/0102 y FIS PI11/02198.



INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS

Madrid, 1 de septiembre de 2015

El doctor Edgar Fernández Malavé, profesor titular de Inmunología del Departamento de Microbiología I de la Universidad Complutense de Madrid, hace constar que la memoria adjunta titulada “Impacto de la haploinsuficiencia de CD3 en la expresión y función del complejo TCR/CD3 en humanos y ratones” ha sido realizada por la licenciada Verónica Pérez Flores bajo su dirección, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

VºBº

Edgar Fernández Malavé

(fecha y firma) 01/09/2015

DNI:05296019-Q

*A Ainara,
la pequeña luz que me
deslumbra cada día*

ALGUN DÍA DIRÉ:
NO FUE FÁCIL, PERO LO LOGRÉ

AGRADECIMIENTOS	I
ABREVIATURAS	II
SUMMARY	III
RESUMEN	IV
I.INTRODUCCION	1
I.1 El linfocito T	3
I.1.1 Naturaleza.....	3
I.1.2 Clasificación	4
I.2 El receptor de antígeno de la célula T.....	5
I.2.1 Las cadenas variables del TCR.....	6
I.2.1 Las cadenas invariantes del TCR.....	8
I.2.3 Estequiometría y ensamblaje del complejo	12
I.2.4 Expresión y topología	17
I.2.5 Regulación.....	19
I.2.6 Función.....	22
I.2.7 Evolución.....	26
I.2.8 Deficiencias descritas en humanos y modelos animales	28
I.2.9 Haploinsuficiencias	32
II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
III. MATERIAL Y MÉTODOS	39
III.1 Material biológico: Muestras humanas	41
III.1.1 Pacientes, familiares y controles	41
III.1.2 Aislamiento de linfocitos T primarios	43
III.1.3 Líneas transformadas de linfocitos T primarios.....	43
III. 2 Material biológico: Muestras de ratón	44
III.2.1 Ratones	44
III.2.2 Procesamiento de órganos	45

III.3 Evaluación fenotípica	45
III.3.1 Citometría extracelular	45
III.3.2 Citometría intracelular	47
III.4 Evaluación funcional	48
III.4.1 Activación celular	48
III.4.2 Análisis morfológico de blastización	49
III.4.3 Inducción de moléculas de activación	49
III.4.4 Análisis de proliferación	50
III.4.5 Modulación del TCR con ésteres de forbol	51
III.4.6 Modulación del TCR con anticuerpos anti-CD3	51
III.4.7 Producción de citocinas	52
III.4.8 Flujo de calcio intracelular	52
III.5 Análisis estadístico	53
III.6 Anticuerpos	54
III.6.1 Anticuerpos contra moléculas humanas	54
III.6.2 Anticuerpos contra moléculas de ratón	55
IV. RESULTADOS	57
IV.1 Efectos de la haploinsuficiencia de CD3 en la expresión del TCR	59
IV.1.1 Expresión intracelular del TCR en haploinsuficiencia de CD3 ...	59
IV.1.2 Expresión extracelular del TCR en haploinsuficiencia de CD3 ..	61
IV.2 Efectos de la haploinsuficiencia de CD3 en la función del TCR	70
IV.2.1 Efectos en el desarrollo de los linfocitos T	70
IV.2.2 Efectos en la activación de los linfocitos T	73
IV.2.2.1 Aumento del tamaño celular	73
IV.2.2.2 Inducción de marcadores de activación	74
IV.2.2.3 Proliferación	78
IV.2.2.4 Modulación del TCR inducida por PMA	80

IV.2.2.5 Modulación del TCR inducida con anticuerpos.....	83
IV.2.2.6 Producción de citocinas	84
IV.2.2.7 Flujo de calcio intracelular	86
V. DISCUSIÓN	89
V.1 Impacto de la haploinsuficiencia de CD3 en la expresión del TCR	92
V.2 Impacto de la haploinsuficiencia de CD3 en la función del TCR.....	97
VI. CONCLUSIONES	106
VII. BIBLIOGRAFÍA	109
PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS.....	V
CURRICULUM VITAE	VI

Agradecimientos

Después de tanto tiempo, después de tanto luchar por conseguir acabar esta tesis jamás pensé que esta parte sería la que más me iba a costar. Quizá sea por el hecho de sentir que por fin puedo pasar página y mirar hacia adelante sin pensar que he fallado, a quien confió en mí, a mi gente y sobre todo a mí. Ahora sí que sí ha llegado el momento de daros las gracias a todos los que de alguna manera habéis hecho que esta tesis haya sido una experiencia especial, quizá la más catártica y sobre todo una de las que más me ha enseñado, y no sólo de ciencia. Mi vida tal y como es ahora mismo no sería la misma si no hubiera cruzado la puerta de inmunología.

En primer lugar gracias al Dr. Edgar Fernández Malavé, director de este trabajo, por todo lo que me ha enseñado, me ha apoyado y me ha ayudado en las distintas fases de este periplo. Es de recibo agradecer también a quien confió en mí en primera instancia, dándome la posibilidad de iniciar mi andadura en este mundo raro de la ciencia y guiarme desde el día uno hasta el último, gracias al Dr. José Ramón Regueiro por ofrecerme entrar en su grupo, por su confianza y por esas charlas de ciencia que guardo con tantísimo cariño. GRACIAS

Durante el tiempo de experimentación muchos fueron las personas con las que me encontré y en las que me apoyé dentro del área de Inmunología de la UCM. Gracias a los profesores que día a día y seminario tras seminario me enseñaron no sólo a responder sino también a preguntar. Gracias también a todos los compañeros con los que compartí no sólo ciencia si no también risas, miedos, diversión, frustración y en definitiva todo lo bueno y lo malo que conllevan las cosas importantes en la vida. He hecho cuentas y son más de veinte nombres así que excusadme si no os nombro a todos porque temo olvidarme de alguien, pero de cada uno me he llevado algo. GRACIAS

A veces la vida da vuelcos y tomas decisiones que te hacen cambiar tus planes iniciales, eso me pasó a mí en el momento en que decidí dejar la bata y probar suerte en la selva empresarial. Aunque con miedo inicial reconozco que fue una de las mejores decisiones de mi vida. Dos han sido las empresas en las que he pasado mi tiempo y en las dos me he encontrado con gente espectacular, que me han ensañado mucho y sobre todo de la que he aprendido a ver la vida de un modo que antes ni me planteaba, en las dos siempre me he encontrado con personas que me han animado muchísimo a continuar con la tesis. En particular quiero dar las gracias a mis compañeros de Advanced Accelerator Applications con los que llevo más de dos años y que han sido los que han hecho posible que pudiera acabar esta tesis y me han dado muchísimas facilidades en esta última etapa del trayecto. Aquí si he de nombrar, gracias a Giovanni Tesoriere por su confianza y la oportunidad de trabajar en algo que me encanta y a José Antonio Sánchez por confiar en mí durante los últimos cinco años y que siempre ha creído en mí. Gracias también a Juan Carlos, mi compañero de batallas, vosotros me habéis demostrado que la profesionalidad no está reñida con la amistad. GRACIAS

A mis amigos, ese grupo que empezó un mismo camino y que el tiempo ha hecho que cada uno acabe en un punto del mundo. Me encanta saber que pase el tiempo que pase nos podemos volver a reunir y sentir como si nos hubiéramos visto ayer. Gracias a Noelia (gran compañera de inmuno y mejor amiga), Josué, Carlos, Miguel, Unai, Labib, Manuel, Cyn. Por mil y una más barbacoas al secador juntos. GRACIAS

Siguiendo con los amigos, hay otro grupo que me ha ayudado mucho en la última fase de este trabajo, son los buenos amigos que he encontrado a 600 km de donde empezó todo esto, gracias por su acogida, por hacernos sentir en Barcelona como en casa y por ser como sois. Gracias a Vanessa, Salva, Silvia, Ivan, Laura, Dani, Marta y Sònia. Per mil i un cafès els divendres. GRÀCIES

A partir de aquí llega el momento de agradecer a los más importantes. Tengo la suerte de tener la mejor familia del mundo con las mejores abuelas, tíos y primos que se puede una imaginar y con los que siempre he podido contar. En especial gracias a mis padres y a mi hermana, ellos tres han sido uno de los pilares para hacer este trabajo, igual que son los pilares de todo lo demás. Gracias por todo el amor que me dais, me habéis enseñado que el hogar no entiende de kilómetros y que las distancias sólo existen en los mapas. Os quiero tanto, pero tanto...GRACIAS

Hasta aquí los agradecimientos por la tesis. Ahora sólo queda agradecer a la tesis. Gracias a esta tesis me crucé con el mejor compañero vital que podría soñar. Esta tesis me regaló un compañero de citometría que me enseñó a trabajar a la distancia de un codazo, y con el que he compartido los últimos diez años de mi vida. Gracias Tesis, gracias por Alberto que me ha dado mucho y enseñado más, porque ocupa mi vida y porque es Él. Por difíciles que hayan estado las cosas su sentido del humor y del amor siempre han podido con todo. Y sobre todo gracias tesis porque en medio de ratones, linfocitos T y autoclaves llegó hace 7 años mi tesoro más preciado, Ainara, la luz de mis ojos y el ser más especial de mi mundo, su sonrisa es mi todo. Acabo los agradecimientos con Ella porque esa pequeña salvaje ha sido mi acicate para cerrar este capítulo de mi vida, porque debía demostrarle que jamás hay que darse por vencido ni creer que no se puede. GRACIAS

Abreviaturas

ABREVIATURAS MÁS COMUNES USADAS EN EL TEXTO

Ab	Antibiótico
Ag	Antígeno
b6	Ratón de la cepa silvestre C57BL/6
Bright	De alta intensidad de fluorescencia, directamente del inglés
BSA	Albúmina de suero bovino
CD	Grupo o “ <i>cluster</i> ” de diferenciación
ConA	Concanavalina A
DN	Doble negativo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doble positivo
Dull	De baja intensidad de fluorescencia, directamente del inglés
EBV	Virus Epstein-Barr
EC	Extracelular
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
FCS	Suero fetal de ternera
FITC	Fluoresceín-isotiocianato
Fluo3AM	Fluo3-aceto metil-éster
g	Valor de la aceleración del campo gravitatorio terrestre
h	horas
HLA	Antígenos humanos de histocompatibilidad
HTLV-I	Virus linfotrópico T humano tipo 1
HVS	<i>Herpesvirus saimiri</i>
IB	Índice de blastización
IC	Intracelular

IFNγ	Interferón γ
IL	Interleucina
Ion	Ionicina
ITAM	Motivos de activación basados en tirosina del inmunoreceptor
KO	“ <i>Knock out</i> ”, directamente del inglés
MFI	Intensidad Media de Fluorescencia
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
min	Minutos
n.a	No analizado
p5	Percentil 5 de normalidad
p95	Percentil 95 de normalidad
PBL	Linfocitos de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Acetato de forbol mirístico
RE	Retículo endoplásmico
rIL2	Interleucina 2 recombinante
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo del “Roswell Park Memorial Institute”
RPMIc	Medio de cultivo RPMI completo (con FCS, Ab y Glu)
SCID	Inmunodeficiencia combinada grave
SD	Desviación estándar
SP	Simple positivo
SEM	Error estándar de la media
TCR/CD3	Receptor de antígeno de la célula T
TH³	Timidina tritiada

TM	Transmembrana
TNFα	Factor α de necrosis tumoral
U.I.	Unidades internacionales
WB	Western Blot, directamente del inglés
WT	Cepa silvestre, directamente del inglés (<i>Wild Type</i>)

Summary

INTRODUCTION

TCR/CD3 ($\alpha\beta$ TCR and $\gamma\delta$ TCR) complexes are members of a family of modular biosensors that are responsible for driving T-cell development, activation, and effector functions. They inform essential checkpoint decisions by relaying key information from their ligand-binding modules (TCR chains) to their signaling modules (CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ and CD3 $\zeta\zeta$) and onto the intracellular signaling apparatus. Their actions shape the T-cell repertoire, as well as T-cell-mediated immunity; yet, the mechanisms that underlie their activity are still to be precisely determined. As with any molecular machine, understanding how they function depends critically on dissecting how their parts fit and work together.

T-cell receptor immunodeficiencies (TCRID) are low-prevalence autosomal recessive diseases characterized by impaired surface TCR expression, frequently associated with peripheral blood T lymphocytopenia, severe combined ID (SCID) and (or) autoimmune symptoms, but not associated with B or natural killer (NK) lymphocytopenia. Several CD3, CD247, and TCR deficiencies have been described which can be classified as complete or partial according to the absence or presence of residual levels of the affected protein. Although rare and sometimes based on single cases, TCRID offer rich information about the underpinnings of human TCR structure and function, which in turn impact our understanding of T-cell development and function.

The study of mice with mutations in the genes encoding invariant and variable TCR subunits allowed characterization of the role of each chain during intrathymic development, and its comparison with human patients. This analysis suggests that, in many aspects, the requirements of such chains are different in each species.

TCRID have been extensively studied. In comparison, little attention has been paid to the effect of haploinsufficiency (heterozygosity) of genes encoding TCR components in T-cell development and function. Although they do not apparently have clinically relevant disease, CD3 haploinsufficient individuals may have T cells with phenotypic and functional features that have not been studied so far, and that could be of help for the characterization of specific and overlapping roles of CD3 proteins, and of value for the identification of carriers of CD3 mutations and for counselling for the prevention of full immunodeficiency.

HYPOTHESIS

The haploinsufficiency of *CD3* genes, and not only their absolute deficiency, have an impact on the expression and function of the TCR/CD3 antigen receptor complex.

OBJECTIVES

We aimed at studying the consequences of CD3 (CD3 γ and CD3 δ) haploinsufficiency in the expression and function of the TCR/CD3 complex of humans and mice, and their relevance to T-cell development and function.

METHODS

After obtaining informed consent, we studied healthy heterozygous carriers of mutations in CD3 γ (γ +/-) of Spanish or Turkish descent and healthy heterozygous carriers of mutations in CD3 δ (δ +/-, δ +/leaky) of Japanese or Mennonite descent. Normal donors (termed+/+) were used as controls. PBL were isolated using standard protocols widely described in the literature. Another model used was human cell lines transformed with herpesvirus saimiri (HVS) or HTLV-1.

In the case of mice models, C57BL/6 mice (+/+) were used as controls. Knock out (KO) mice for the different CD3 genes were kindly provided by Dr. D. Kappes and by Dr. I. Luescher. In particular, the heterozygous mice were obtained by crossing females +/+ with CD3 δ KO males or with CD3 γ KO males. Mice were sacrificed following animal welfare standards, and peripheral blood, thymus, spleen and lymph nodes were extracted. All these samples were processed using standard protocols.

Phenotypical analyses were performed by extracellular and intracellular staining which were analyzed by multicolor flow cytometry. In the case of functional assays, cells were previously activated with anti-CD3 antibodies, PHA or ConA.

The assessment of the induction of early activation markers, cytokines, cell proliferation or calcium fluxes was performed according to standard protocols extensively described in the literature.

RESULTS AND DISCUSSION

First of all, intracellular staining results showed that CD3 γ haploinsufficiency was associated with a reduction in the intracellular expression of this TCR component in both human and mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes. On the other hand, the haploinsufficiency defect was also reflected in the surface expression of the TCR in both species. In the case of humans, there was also a discordant reduction of surface $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR expression in CD3 $\gamma^{+/-}$ but not CD3 $\delta^{+/-}$ T lymphocytes. This discordant reduction between T-cell lineages was not observed in mice.

The effect of CD3 haploinsufficiency on development of T cells was analyzed by studying the absolute number of these cells in the periphery. In humans, it was observed that in the case of $\gamma^{+/-}$ or $\delta^{+/-}$ individuals, the absolute number of both total and T-lymphocyte subpopulations was significantly reduced compared to normal controls.

Despite this reduction, these numbers were within the normal range. In contrast, CD3 haploinsufficiency in mice did not correlate with a decrease in absolute numbers of T lymphocytes.

In a normal situation, CD4⁺ T lymphocytes are twice more abundant than CD8⁺ T lymphocytes. Curiously, this CD4⁺/CD8⁺ ratio was significantly reduced in CD3 γ ^{+/-} mice, and more prominently in the CD3 γ haploinsufficiency than in CD3 δ haploinsufficiency. In contrast, human T cells exhibited an opposite trend, with both CD3 haploinsufficiencies causing an increase in the CD4⁺/CD8⁺ ratio. In mice, the decreased CD4⁺/CD8⁺ ratio was due to an increased frequency of CD8⁺ T cells. In humans, in contrast, the ratio was increased because CD8⁺ T cells were reduced.

Different activation and functional markers were affected by CD3 γ and, to a lesser extent, by CD3 δ haploinsufficiency in both humans and mouse; including CD69 induction and cellular proliferation. Other functions such as Th1 cytokine production or intracellular calcium fluxes were also affected in human CD3 γ haploinsufficient individuals.

CONCLUSIONS

In this Thesis we have demonstrated that haploinsufficiency of CD3 has an impact on the expression of TCR in both humans and mice. From the results obtained, it can be concluded that the haploinsufficiency of CD3 γ has a greater impact than that of CD3 δ in TCR expression on the surface of human and mouse T cells. Moreover, the impact of CD3 haploinsufficiency on TCR expression depends on the type of TCR. This suggests the existence of distinct structural constraints for the assembly, stabilization,

and expression of the $\alpha\beta$ TCR *versus* the $\gamma\delta$ TCR. In regard to this, we propose a model of human TCR assembly which unify previous data and models.

Finally, CD3 γ and, to a lesser extent, CD3 δ haploinsufficiency has a not anticipated impact in T-cell development and activation in both humans and mice. Yet, the mechanisms underlying the impact of CD3 haploinsufficiency in TCR function remain to be precisely determined.

PUBLICATIONS

- **Pérez-Flores V.**, Guardo A.C., Rossi N.E., Recio M.J., Reiné J., Regueiro J.R. 2006. El complejo TCR/CD3: especificidad con flexibilidad. *Inmunología*. 25(1): 50-56.
- Siegers G.M., Swamy M., Fernández-Malavé E., Minguet S., Rathmann S., Guardo A.C., **Pérez-Flores V.**, Regueiro J.R., Alarcón B., Fisch P., Schamel W.W.A. 2007. Different composition of the human and the mouse $\gamma\delta$ T cell receptor explains different phenotypes of CD3 γ and CD3 δ immunodeficiencies. *J. Exp. Med.* 204 (11):2537-44.
- Recio M.J., Moreno-Pelayo M.A., Kiliç S.S., Guardo A.C., Sanal O., Allende L., **Pérez-Flores V.**, Mencía A., Modamio-Høybjør S., Seoane E., and Regueiro J.R. 2007. Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. *J. Immunol.* 178(4):2556-2564.
- Muñoz-Ruiz M.*, **Pérez-Flores V.***, Garcillán B., Guardo A.C., Mazariegos M.S., Takada H., Allende L.M., Kilic S.S, Sanal O., Roifman C.M., López-Granados E., Recio M.J., Martínez-Naves E., Fernández-Malavé E., Regueiro J.R. 2013. Human CD3 γ , but not CD3 δ , haploinsufficiency differentially impairs $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ surface TCR expression. *BMC Immunology*. 14:3. *Equal contributors

Resumen

Las inmunodeficiencias humanas del receptor de antígeno de los linfocitos T (TCR) son enfermedades autosómicas recesivas con baja prevalencia, caracterizadas por un defecto de expresión del TCR asociado a una linfopenia T selectiva. La ausencia congénita de componentes del TCR tiene un impacto diferencial en el desarrollo y función de los linfocitos T, que depende de la cadena del TCR afectada y de la especie, siendo en algunos casos diferente en los pacientes humanos en comparación con los modelos en ratones.

Las inmunodeficiencias del TCR han sido ampliamente estudiadas, en particular las de las sub-unidades CD3 del complejo receptor. En contraste, hasta ahora es muy poca la atención que se le ha prestado a los potenciales efectos de la haploinsuficiencia de componentes del TCR en el desarrollo, fenotipo y función de los linfocitos T. Esto es debido en gran parte al hecho de que los individuos haploinsuficientes (portadores de mutaciones nulas en heterocigosis) no presentan alteraciones obvias de la inmunidad mediada por células T o signos de enfermedad.

En este trabajo se analiza por primera vez, en humanos y modelos de ratones, el impacto de la haploinsuficiencia de CD3 γ y CD3 δ en la expresión y funcionalidad del TCR, y su potencial relevancia en el desarrollo y función de los linfocitos T. Los resultados indican que la haploinsuficiencia de CD3 γ y, en menor medida, la de CD3 δ causa una disminución en la expresión del TCR en la superficie de las células T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$, y provoca alteraciones claras en el desarrollo y función de los linfocitos T $\alpha\beta$ en ambas especies.

Por lo tanto, la haploinsuficiencia de CD3 tiene un impacto en la biología de los linfocitos T, que aunque siendo menos marcado que el de la deficiencia absoluta, puede ser relevante para la comprensión de las funciones específicas y redundantes de las cadenas CD3 como componentes del TCR en las células T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$, y para la identificación de individuos portadores de mutación en los casos de inmunodeficiencias humanas.

I. Introducción

I.1 EL LINFOCITO T

I.1.1 Naturaleza

Los linfocitos T constituyen un grupo heterogéneo de células que desempeñan una función crítica en la respuesta inmunitaria adaptativa. El 25% de los leucocitos de sangre periférica son células T y se caracterizan por la presencia en su membrana plasmática de un complejo multiproteico denominado receptor de antígeno de la célula T (complejo TCR/CD3). Los linfocitos T son células de origen tímico.

Este tipo celular es capaz de reconocer fragmentos de péptidos presentados por las células presentadoras profesionales (APC) o por células dianas en el contexto de las moléculas de MHC propias (Fremont et al., 1996). La identificación y caracterización de las moléculas que intervienen en las distintas fases de este proceso ha aumentado nuestro entendimiento de cómo el linfocito T traduce las señales percibidas en la membrana en respuestas eficaces y específicas. Entre ellas destacan la proliferación, apoptosis, producción de citocinas o tolerancia frente a determinados antígenos. Sabemos más acerca de las principales moléculas que interaccionan en la membrana del linfocito T y de la célula presentadora de antígeno, así como de los diversos eslabones moleculares que se enlazan a nivel intracelular para elaborar una respuesta coordinada hasta el núcleo. Conocemos parte del lenguaje bioquímico que emplea la célula, como pueden ser la fosforilación y defosforilación en residuos de tirosina, serina o treonina de diversos sustratos que permite responder a los estímulos externos. Este conjunto de conocimientos ha creado una plataforma muy sólida para el estudio de la disfunción celular linfocitaria que subyace a estados patológicos tan diversos como la vigilancia contra el cáncer, la susceptibilidad a infecciones, la autoinmunidad o las inmunodeficiencias.

I.1.2 Clasificación

Las células T están compuestas por dos sub-poblaciones distintas. La población mayoritaria (90-95%) corresponde a linfocitos $T\alpha\beta$ (Brenner et al., 1986) y la minoritaria (1-10%), a la par que peor caracterizada, a los $T\gamma\delta$ (Li et al., 1998). En la sub-población $T\alpha\beta$ se distinguen las células pertenecientes al linaje CD4 y las pertenecientes al linaje CD8. Los linfocitos T CD4 actúan como coordinadores de la respuesta inmunitaria, controlando la acción de otros linfocitos y de los macrófagos. En base a sus funciones, su patrón de citocinas y la expresión de factores de transcripción específicos las células CD4 o Th (“T helper”) se diferencian en al menos cuatro grandes sub-poblaciones: Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras (Treg) (Zhu et al., 2009; Zhu et al., 2010). Por su parte los linfocitos T CD8 (T citotóxicos o Tc) son responsables, entre otras funciones, de la destrucción de células infectadas y tumorales (Fig. I.1).

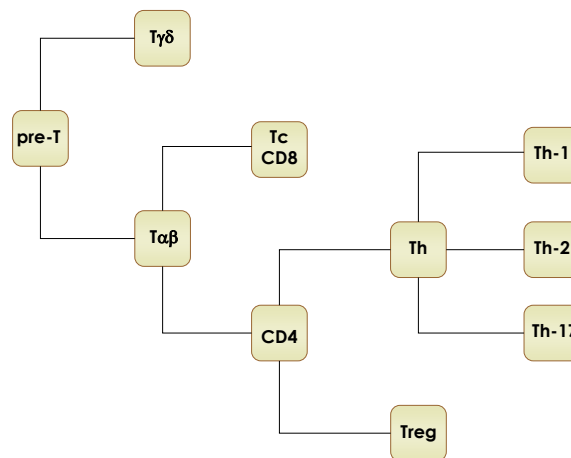


Fig. I.1. Clasificación de los linfocitos T. Diagrama de los distintos tipos de linfocitos T que se pueden encontrar en un mamífero.

El reconocimiento de antígeno llevado a cabo por ambas sub-poblaciones celulares también es diferente, ya que cuando el antígeno es presentado por moléculas MHC de clase II es el linfocito Th el que actúa, mientras que el Tc hace lo propio en el entorno de las moléculas

MHC de clase I (von Boehmer et al., 1989). Por el contrario, en el caso de los linfocitos T $\gamma\delta$ el reconocimiento antigénico es muy heterogéneo: algunos reconocen antígenos restringidos por moléculas MHC clásicas, otros por no clásicas y otros se unen directamente al antígeno (Das et al., 2001).

I.2 EL RECEPTOR DE ANTÍGENO DE LA CÉLULA T

El repertorio útil de células T de un individuo es el resultado de un proceso estocástico de generación celular, seguido de un proceso de selección en el que se eliminan la mayoría de las células producidas. Este mecanismo incluye selección positiva y negativa y garantiza la adecuación de los linfocitos T para constituir la principal barrera de la inmunidad adaptativa (Steele et al., 1993; Nossal, 1994). Todo este proceso de selección no es más que una comprobación sobre cómo es y cómo funciona el receptor de antígeno de la célula T (TCR) expresado en la membrana de los linfocitos T en desarrollo. Por esta razón, un buen conocimiento de la composición, organización y función de esta macro-estructura es necesario para comprender la fisiopatología de la respuesta inmunitaria adaptativa.

El complejo TCR está compuesto por dos módulos estructural y funcionalmente diferenciados, unidos por interacciones no covalentes (Wegener et al., 1992; Fig. I.2). El primer módulo es el denominado TCR (del inglés *T Cell Receptor*), un heterodímero de dos cadenas variables que están glicosiladas y que se unen entre sí por un puente disulfuro. El segundo módulo se denomina genéricamente CD3 y se compone de una serie de proteínas invariantes asociadas entre si de forma no covalente, excepto $\xi\zeta$ (Reinherz et al., 1982, Clevers et al., 1988, Wucherpfennig et al., 2010).

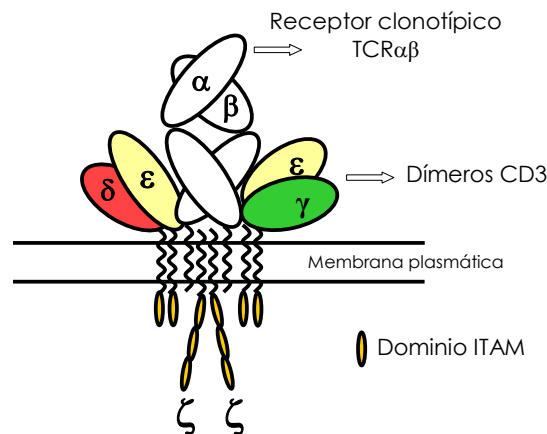


Fig. 1.2. Esquema simplificado de la composición del complejo TCR/CD3 en la superficie del linfocito T. Las moléculas de histocompatibilidad presentan el antígeno que interacciona con TCRα y TCRβ, permitiendo que las cadenas CD3 (CD3γ, CD3δ, CD3ε y CD3ζ) transmitan señales al interior celular.

I.2.1 Las cadenas variables del TCR

La función del módulo TCR es el reconocimiento clonotípico de antígenos debido a su gran variabilidad. La mayoría de las células expresan un TCRαβ compuesto por las cadenas variables α y β que típicamente reconocen péptidos unidos al MHC de una célula presentadora de antígeno (APC). Un pequeño porcentaje de células T expresan el TCRγδ, constituido por cadenas TCR γ y δ. Estas cadenas son muy heterogéneas desde el punto de vista antigénico, ya que se unen directamente a glicoproteínas derivadas de patógenos o a moléculas de histocompatibilidad no clásicas (Chien et al., 1996; Das et al., 2001; Adams et al., 2005).

A pesar de la diferencia entre TCRαβ y TCRγδ en las secuencias de sus regiones variables, su estructura génica y proteica es muy similar entre sí. Se trata de proteínas de membrana de tipo I con cinco segmentos bien definidos: un dominio variable extracelular, codificado por los segmentos V, (D) y J que son reordenados clonotípicamente; un dominio constante extracelular codificado por el segmento génico constante C; un segmento conector; un dominio transmembranal y un dominio intracelular muy corto. El dominio constante de las

cadena β , δ y γ adopta una estructura estándar equivalente a la de las inmunoglobulinas (Igs) (García et al., 1996, Adams et al., 2005). Esta estructura no la posee la región constante de la cadena α ($C\alpha$) ya que carece de la estructura en banda beta plegada necesaria (Borst et al., 1993, Rowen et al., 1996)

Cadena del TCR	Cromosoma	Peso molecular (kD)	Puentes de Azufre ¹		Regiones variables			Sitios potenciales de N glicosilación
			Intra	Inter	V	D	J	
α	14q11-q12	45-60	2	1 con β	100	0	50	6
β	7q35	40-50	2	1 con α	25	2	12	2
γ	7p14	45-60	2	0 ó 1 con δ	7	0	3	4
δ	14q11-12	40-60	2	0 ó 1 con γ	10	2	2	2

Tabla I.1. Información genérica sobre las cadenas del TCR en humanos. ¹Intra: intracatenarios, Inter.: intercatenarios. Datos tomados de Clevers et al., 1988 y Kabelitz et al., 1999.

Las regiones V, J y D (en su caso) de ambas cadenas α y β (o γ y δ) se unen de modo simultáneo el péptido antigénico y la molécula MHC que lo presenta. El hecho de que estas cadenas puedan unir una inmensa variedad de antígenos se debe a reordenamientos clonales que sufren los genes V, (D) y J durante la ontogenia (Davis et al., 1990). Esto permite la generación potencial de entre 10^{17} - 10^{20} tipos diferentes de receptores en un individuo concreto (Weiss, 1990). En la práctica, la diversidad real se estima muy inferior, en el entorno de 25×10^6 (Arstila et al., 1999). Los fragmentos génicos constantes (C) codifican tanto los dominios de anclaje a la membrana, ricos en residuos hidrofóbicos, como los dominios intracelulares (5 a 12 aminoácidos). Estos últimos son pequeñas regiones incapaces de acoplar la señal generada por la unión del antígeno con la maquinaria

intracelular encargada de la transducción de señales. Para desempeñar esta función es necesaria la presencia de las cadenas invariantes CD3.

I.2.2 Las cadenas invariantes CD3

El módulo CD3 es un conjunto de proteínas invariables constituido por las cadenas CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ y ζ (o CD247). Tiene dos funciones principales, la transducción de señales de reconocimiento antigénico al interior celular y la regulación de los niveles de expresión del complejo en la superficie (Ashwell y Klausner, 1990). Las cadenas CD3 γ , CD3 δ (Krissansen et al., 1986) y CD3 ϵ (Borst et al., 1985) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y son codificadas por genes próximos entre si, localizados en humanos en el cromosoma 11 (Tunnacliffe et al., 1987). La cadena ζ cuyo gen se localiza en el cromosoma 1q22 (Baniyash et al., 1989), se asocia al complejo TCR en el 90% de los casos en forma de homodímero $\zeta\zeta$, o bien en menor proporción como heterodímero con otras cadenas de su misma familia (cadena η -derivada de un procesamiento alternativo en el ARNm de la cadena ζ ; Clayton et al., 1991- o la cadena γ del receptor Fc ϵ RI; Baniyash et al., 1988; Orloff et al., 1990). Su secuencia no es similar a la de las otras cadenas CD3, pero si a la de la cadena γ que forma parte del receptor Fc ϵ RI y se puede asociar a otras proteínas además de al TCR, por ejemplo, al receptor para el fragmento Fc de la IgG en células NK (Fc γ RIII), siempre con la transmisión de señal como función primordial.

Las cadenas CD3 determinarán, en última instancia, la maduración/apoptosis de la célula T en el timo y la activación o anergia/apoptosis en la periferia (Malissen et al., 1999).

Cadena	Cromosoma	Peso molecular (kD)	Puentes de Azufre ¹		Dominios ITAM	Sitios potenciales de N glicosilación
			Intra	Inter		
CD3 γ	11q23	25-28	1	0	1	2
CD3 δ	11q23	20	1	0	1	2
CD3 ϵ	11q23	20	1	0	1	0
CD247 (ζ)	1q22-q23	16	0	1 con ζ	3	0

Tabla I.2. Información genérica sobre las cadenas CD3 en humanos. ¹Intra: intracatenarios, Inter.: intercatenarios. Datos tomados de Clevers et al. 1988.

Las cadenas CD3 poseen una serie de características importantes en función de su estructura y dominios (Fig. I.3). En humanos, dichas características son las siguientes:

1. Región extracelular (EC): las cadenas CD3 γ , δ , y ϵ presentan un dominio tipo inmunoglobulina, de 89, 79 y 104 aminoácidos, respectivamente, seguido de un segmento de conexión. La cadena ζ , por su parte posee un dominio extracelular de tan sólo 9 aminoácidos entre los que se encuentra una cisteína. Este residuo es el responsable de la homo/heterodimerización de la cadena ζ .

2. Región transmembrana (TM): es la porción mejor conservada y más corta de todas. Se compone de aminoácidos cargados negativamente que interaccionan con las cargas positivas de las cadenas TCR. Estas uniones electrostáticas entre las cadenas TCR y las cadenas del CD3 son necesarias para el correcto ensamblaje del complejo (Cosson et al., 1991, Call y Wucherfening, 2004^{a,b}).

3. Región intracelular (IC): región fundamental para el desempeño del papel que juega el complejo TCR/CD3 como transmisor de señales al interior celular. A diferencia del módulo

TCR, esta región posee un gran tamaño (44 aminoácidos en CD3 γ , 55 en CD3 ϵ y 113 en CD3 ζ), y contiene diferentes secuencias que sirven como diana de proteínas reguladoras (Klausner et al., 1990; Exley et al., 1991; Dietrich et al., 1994; Dave et al., 1997; Marie-Cardine y Schraven, 1999; Kane et al., 2000, Brodeur et al., 2009).

Las secuencias reguladoras de la señalización más importantes son las denominadas ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). Estas secuencias se encuentran en el tallo citoplasmático de todas las cadenas CD3 y están muy conservadas. Poseen dos residuos de tirosina (Y), separados entre si por unos dieciocho aminoácidos que son blanco de fosforilaciones por parte de las quinasas asociadas al receptor (Latour, 2001). La secuencia canónica de los ITAM es: ...Yxxx[L/I]_{x7-11}Yxx[L/I]... (Reth et al., 1992; Weiss y Littman, 1994). Cada cadena CD3 contiene un motivo ITAM, excepto ζ que contiene tres, de modo que en un complejo TCR/CD3 de estequiometría (TCR $\alpha\beta$ CD3 $\epsilon\delta\epsilon\gamma\zeta_2$) existen 10 secuencias de este tipo (Love et al., 2000; Alarcón et al., 2003).

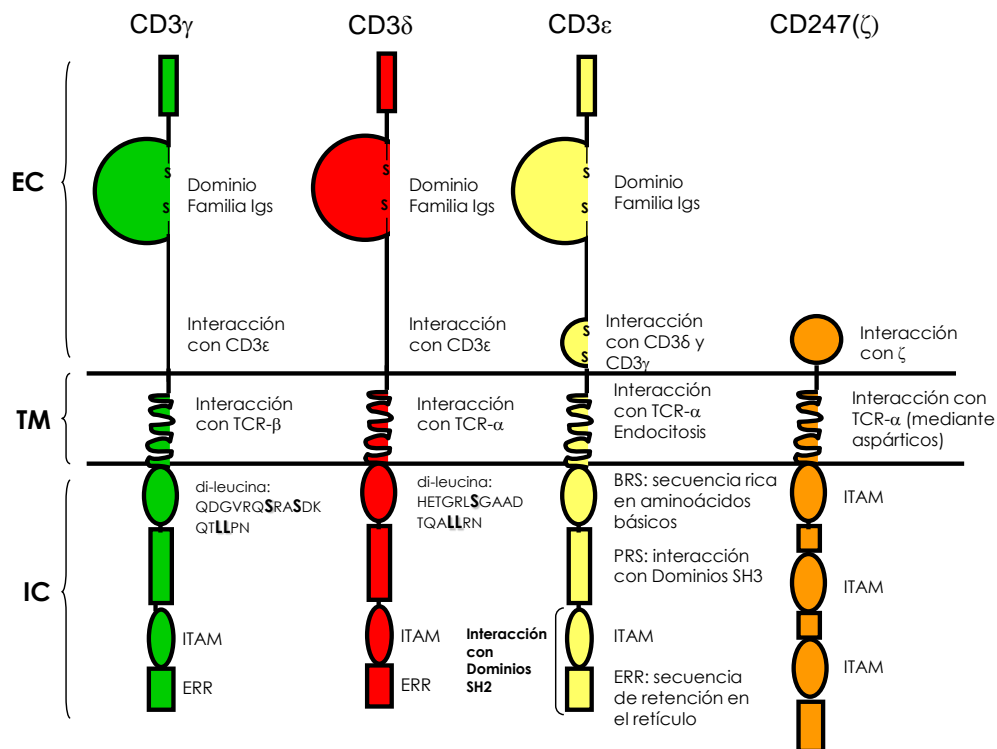


Figura I.3. Dominios de las cadenas CD3 y CD247.

Tal y como se ha explicado, y como muestra la figura anterior, hay distintas cadenas CD3 parecidas entre sí formando parte de un mismo receptor. Durante los últimos años la multiplicidad de cadenas CD3 ha sido ampliamente estudiada, llegándose a proponer dos teorías contrapuestas que la explican: la redundancia de funciones y la especificidad de funciones. A continuación trataremos de explicarlas brevemente:

1. **Función redundante de las cadenas CD3:** este modelo supone que todas las cadenas que forman el complejo TCR/CD3 participan de manera equitativa en el desarrollo de las funciones que de él dependen, de modo que la existencia de las cuatro moléculas CD3 sería una forma de amplificar la débil señal original de reconocimiento antigénico. De esta forma, las secuencias ITAM, idénticas en todas las cadenas CD3, funcionan como un sistema de amplificación de la señal ya que al trimerizar los ITAMs se consigue una señal más potente que la obtenida con uno solo (Irving et al., 1993). Esta superposición de funciones haría superflua la participación de todos los ITAMs, pudiéndose prescindir de algunos para superar correctamente el desarrollo y la selección, como es el caso de los de la cadena ζ (Shores et al., 1994; Ardouin et al., 1999 y van Oers et al., 2000). Otros datos experimentales que avalan esta teoría provienen de las secuencias ITAMs aisladas a partir de CD3 ϵ y CD3 ζ , las cuales al ser expresadas en quimeras con receptores que carecen de los otros componentes de CD3 son suficientes para transducir señales de activación (Irving et al., 1991; Letourneur et al., 1992^{a,b}; Eshhar et al., 1993) o quimeras de CD3 ϵ que con los ITAMs de CD3 ζ son capaces de recuperar la timopoyesis en ratones RAG⁻ (Shinkai et al., 1995). Más datos en la misma dirección son los derivados de sustituir CD3 ζ por una cadena ζ truncada, (carente del tallo citoplásmico, es decir sin ITAMs), el complejo resultante sigue siendo capaz de señalizar, indicando que la función puede ser suplida por otras moléculas CD3 (Wegener et al., 1992). Por otro lado, se ha descrito que las secuencias ITAM de las cadenas CD3 funcionan mediante interacción directa con dominios SH2 (Hatada et al., 1995) de proteínas señalizadoras (ej. PI3K, Shc o ZAP70), y se ha demostrado que hay solapamiento de unión a los diferentes ITAM. De este modo, ZAP70 puede unirse por ejemplo a ITAM de CD3 ζ y de CD3 ϵ (Chan et al., 1992; Strauss y Weiss, 1993). Sin embargo, el hecho de que estas secuencias ITAM presenten tanta diversidad en sus regiones de unión a dominios SH2, así como el hecho de que las afinidades entre los distintos ITAM y las respectivas quinasas antes mencionadas sean tan diferentes (Ravichandran et al., 1993; Exley et al., 1994; Isakov et al., 1995) deja abierta la puerta a otras explicaciones.

2. Función especializada de las cadenas CD3: con este modelo se propone que cada una de las cadenas CD3 está encargada de transmitir señales específicas. Un ejemplo reciente que sostiene esta teoría lo encontramos en el exhaustivo estudio de la porción intracelular de CD3 ϵ , realizado en ratón por Brodeur y col. (2009). En él se describe un papel específico para la porción intracelular de esta cadena durante el desarrollo (transición de DN a DP) que además no puede ser reemplazado por los tallos intracitoplásmáticos de CD3 γ o de CD3 δ , lo que podría confirmar la existencia de una función diferencial de la porción intracelular de CD3 ϵ con respecto al resto de cadenas CD3.

En definitiva, la existencia de ambos modelos no tiene que ser necesariamente excluyente ya que para algunas vías señalizadoras las cadenas CD3 parecen actuar de forma redundante, mientras que para otras cada una de ellas resulta desempeñar un rol específico. La validez de cada modelo dependería, entre otras cosas, de la avidéz del TCR por el antígeno, del estado de diferenciación de la célula T o incluso del medio ambiente en el que esté dicha célula (Pitcher et al., 2003).

I.2.3 Estequiometría y ensamblaje del complejo

La estequiometría mínima del TCR ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, llegándose a la conclusión de que la más probable para el TCR $\alpha\beta$ /CD3 es $\alpha\beta/\epsilon\delta\epsilon\gamma\zeta\zeta$. La síntesis de todos los elementos del TCR se realiza de forma simultánea en la célula. Sin embargo su posterior ensamblaje en el RE sigue un patrón ordenado y secuencial. Así, se ha descrito que los dímeros del complejo CD3 se van uniendo uno a uno al TCR previamente dimerizado, en el orden $\delta\epsilon$, $\gamma\epsilon$ y $\zeta\zeta$ respectivamente (Call y Wucherpfening, 2004^a) a través de interacciones polares transmembranales. De tal forma que en el caso del linaje T $\alpha\beta$, a las cadenas clonotípicas TCR se le adicionan los heterodímeros CD3 $\epsilon\delta$ y CD3 $\epsilon\gamma$ previamente formados por unión no covalente de sus respectivos dominios extracelulares (Koning et al., 1990; Manolios et al., 1990; Dietrich et al., 1996). El paso final es la asociación con las cadenas $\zeta(\zeta_2)$ (Call, 2006) y la exportación a membrana de la estructura TRC $\alpha\beta$ CD3 $\epsilon\delta\epsilon\gamma\zeta_2$ completa (Ohashi et al., 1985; Saito et al., 1987; Weissman et al., 1989; Blumberg et al., 1990; Carson et al., 1991).

Si analizamos con detalle las “pautas” de interacción que restringen la composición final del complejo, se pone de manifiesto la existencia de tres interacciones directrices (Fig. I.4). La primera de ellas es una interacción directa exclusiva de la cadena TCR α (cargas positivas, Arg y Lys), con las cadenas CD3 ϵ , CD3 δ (residuos de carga negativa) en la zona transmembranal (TM) (John et al., 1989; Blumberg et al., 1990; Cosson et al., 1991; Call et al., 2002; Arnett et al., 2004). La segunda, es de nuevo otra interacción directa de la cadena TCR β (residuo de carga positiva, Lys) con un residuo de carga negativa de un aminoácido de la zona transmembranal de la cadena CD3 δ (Morley et al., 1988; Alcover et al., 1990) o bien mediante contactos extracelulares con las cadenas CD3 ϵ o CD3 γ (Manolios et al., 1994; Call et al., 2002). En último lugar para la asociación estable y correcta de la cadena ζ , se necesitan residuos cercanos a la membrana tanto en su pequeña zona extracelular (Bolliger et al., 1997; Johanson et al., 1999), como en los dominios extracelulares de las cadenas TCR α y TCR β (Geisler et al., 1992; Caspar-Bauguil et al., 1994; Backstrom et al., 1996).

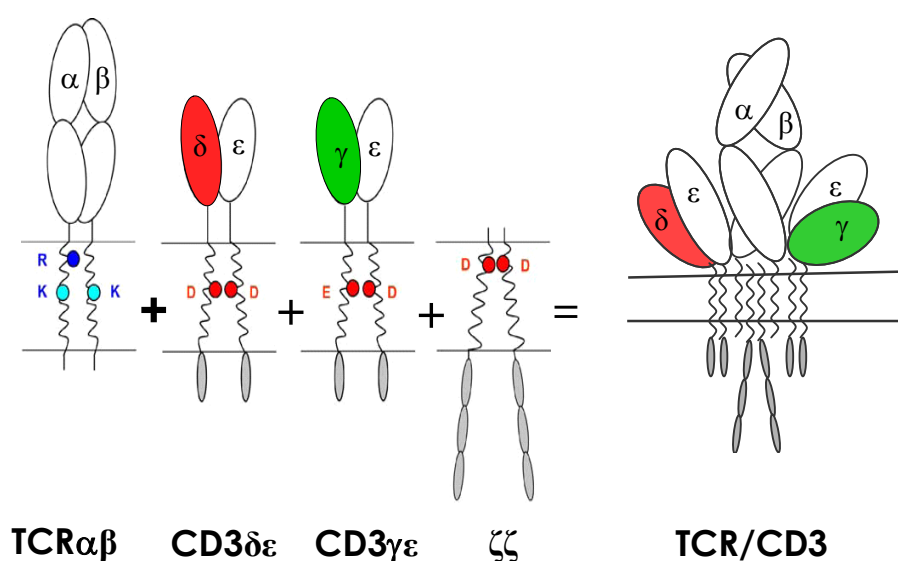


Fig. I.4. Ensamblaje de los dímeros que componen el TCR $\alpha\beta$. Se representan los residuos transmembranales necesarios para las interacciones polares entre los dímeros (K: lisina, D: aspártico, E: glutámico). Adaptado de Call y Wucherpfening, 2004.

Ohashi y col. en 1985 describieron la necesidad de participación de todas las cadenas para la expresión del TCR/CD3 en membrana. Sin embargo, en estudios con células no T como Hela o 3T3 se ha observado que es posible la expresión en membrana de complejos sin CD3 γ o CD3 δ (Fig. I.5). De esto se deduce que todas las cadenas no son igualmente necesarias para el

correcto ensamblaje y expresión del complejo TCR/CD3 en membrana, si bien la falta de CD3 ϵ , CD3 ζ , TCR α o TCR β compromete de manera definitiva la síntesis y ensamblaje del mismo tanto en humanos (Kappes y Tonegawa, 1991) como en ratón (Szymczak et al., 2004).

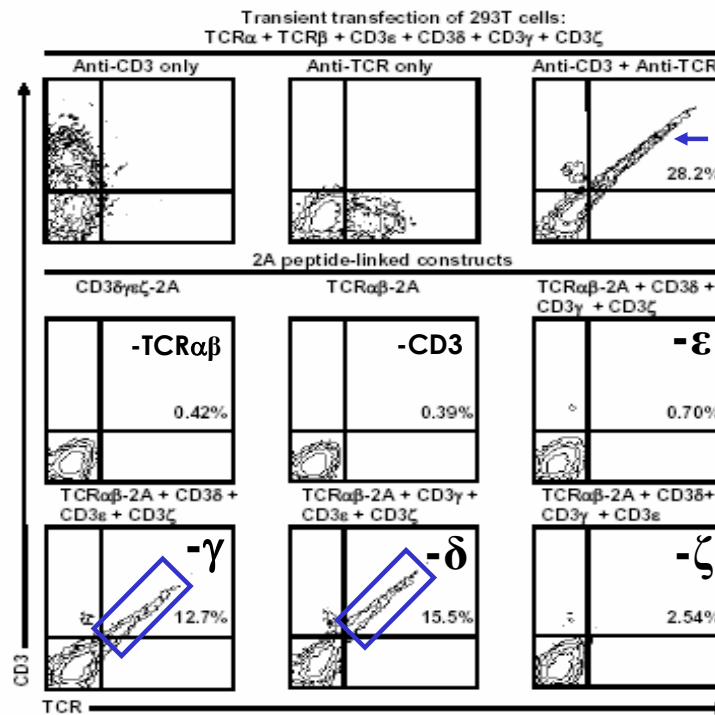


Fig. I.5. Experimentos de transfección de genes TCR/CD3 en células no T. Ensayos en células 293T que demuestran que sólo en ausencia de CD3 γ y CD3 δ se sigue detectando la expresión del complejo TCR/CD3 en la membrana celular. Adaptado de Szymczak et al., 2004.

Este hecho también se ha observado en los propios linfocitos T de humanos y de ratón cuando carecen de alguna de estas cadenas (Arnáiz-Villena et al., 1992; Dave et al., 1997; Haks et al., 1998). Así, en la figura I.6 se indican las posibles estequiometrías de los complejos incompletos en los que la cadena ausente puede ser sustituida por otra.

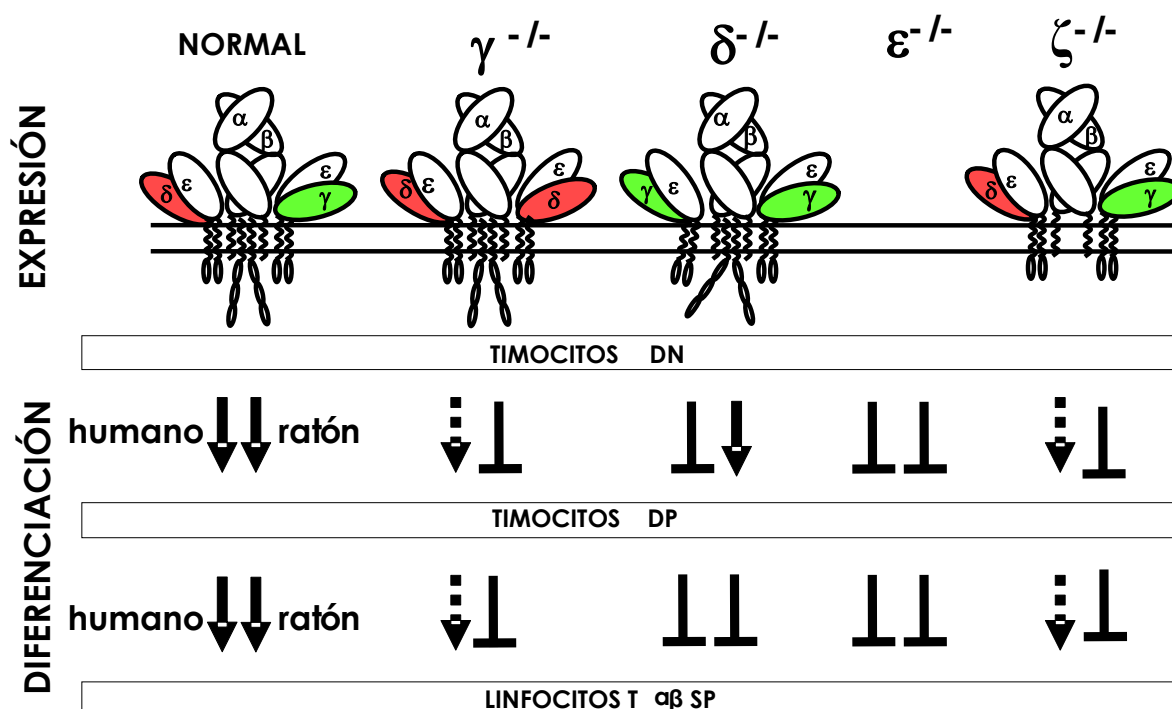


Fig. I.6. Desarrollo del linaje $T\alpha\beta$, para humano y ratón, en diferentes deficiencias de CD3. Estequiometría propuesta para el $TCR\alpha\beta$ en condiciones normales y en ausencia de distintas cadenas CD3 (arriba), y efectos diferenciales observados en el desarrollo linfóide T en humanos versus ratón (abajo). Tomada de Pérez-Flores et al., 2006.

Si analizamos la estequiometría del complejo $TCR\gamma\delta/CD3$ (Fig. I.7), lo primero que hay que destacar es que este complejo carece en ratón de la cadena $CD3\delta$, y tiene la estequiometría $\gamma\delta/\epsilon\gamma\epsilon\gamma\zeta\zeta$, aunque una de las cadenas $CD3\gamma$ presenta glicosilación diferencial, sobre todo tras la activación, que la acerca al peso aparente de $CD3\delta$ (Hayes y Love, 2006). Esto permite explicar por qué el TCR y el desarrollo de los linfocitos $T\gamma\delta$ no se ven afectados en ratones $\delta^{-/-}$ (Hayes y Love, 2002). Aunque en ese momento se propuso una estructura similar para el $TCR\gamma\delta/CD3$ humano, recientemente se ha demostrado que ésta es similar a la del $TCR\alpha\beta/CD3$ (Siegers et al., 2007). Dicha afirmación la avalan datos obtenidos del estudio de las deficiencias de CD3 en humanos. Los individuos deficientes de $CD3\delta$ carecen de linfocitos $T\gamma\delta$ (Dadi et al., 2003), mientras que los deficientes de $CD3\gamma$ presentan números casi normales, que además conservan mejor la expresión del complejo que los linfocitos $T\alpha\beta$ (Siegers et al., 2007). Además, la cadena $TCR\delta$ humana, como ocurre con $TCR\alpha$, puede asociarse a los dímeros $CD3\epsilon\gamma\epsilon\delta$ (Alibaud et

al., 2001). Todos estos datos apoyan la estequiometría $\gamma\delta/\epsilon\gamma\epsilon\delta\zeta\zeta$ para las células $T\gamma\delta$ humanas, parecida por tanto a la ya descrita para los linfocitos $T\alpha\beta$ humanos.

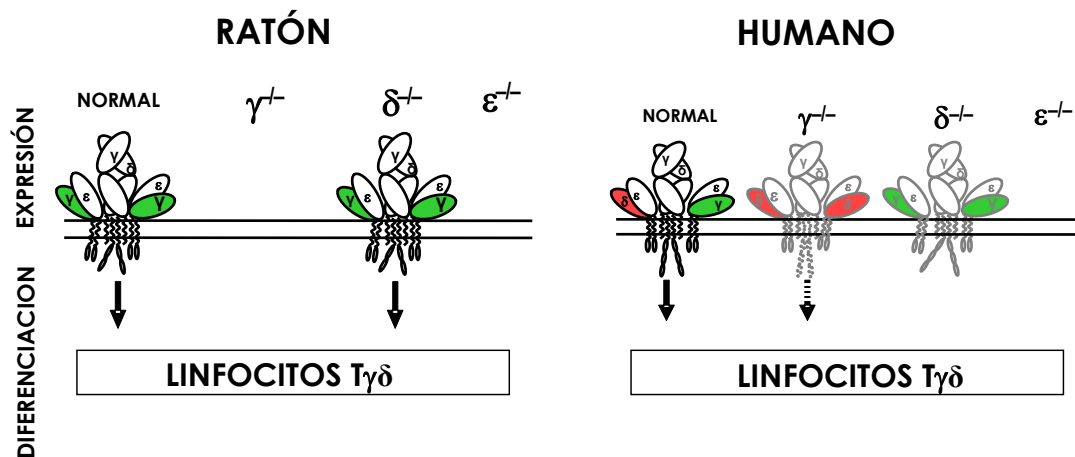
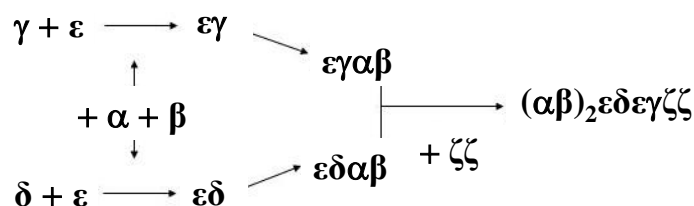


Fig. 1.7. Estequiometría propuesta para el TCR $\gamma\delta$ en condiciones normales y en ausencia de distintas cadenas CD3. Tomado de Pérez-Flores et al., 2006.

Hasta el momento hemos visto el TCR desde el prisma del modelo monovalente, sin embargo existe una alternativa a éste, con menos defensores; se trata del modelo de doble receptor clonotípico (Fig. 1.8), basado en que las cadenas del TCR podrían interactuar indistintamente con las subunidades $CD3\epsilon\gamma$ y $CD3\epsilon\delta$, lo que favorece la conformación de un receptor con estequiometría $(\alpha\beta)_2\epsilon\delta\epsilon\gamma\zeta\zeta$ (Exley et al., 1995; San Jose et al., 1998; Fernandez-Miguel et al., 1999).

A.



B.

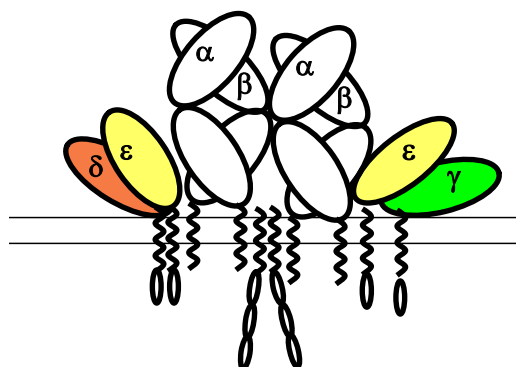


Fig. I.8. Modelo del doble receptor clonotípico para el complejo TCR/CD3. A. Modelo alternativo de ensamblaje en el que la asociación indistinta de las cadenas CD3 $\epsilon\delta$ y $\epsilon\gamma$ con las cadenas TCR α y TCR β permitiría la construcción de un complejo con dos heterodímeros TCR $\alpha\beta$. B. Esquema simplificado de un TCR bivalente en la membrana plasmática.

I.2.4 Expresión y topología

Para la expresión del complejo TCR/CD3 en la superficie celular es necesaria su exportación a la membrana plasmática. Para ello, en primer lugar, tienen una función crucial las chaperonas que pliegan correctamente las cadenas del complejo (Alarcón et al., 1988; Bonifacino et al., 1988; Davis y Chien., 1993) y enmascaran las señales de retención en el RE de las cadenas sintetizadas “*de novo*”, favoreciendo así su paso al aparato de Golgi (Mallabiabarrena et al., 1992). Una vez liberado, el complejo completo continúa su ruta de maduración, modificando su glicosilación, por ejemplo, desde el RE al aparato de Golgi. Una vez allí es transportado en vesículas hasta alcanzar la membrana plasmática. La expresión del complejo en la superficie requiere la fusión de las vesículas con la membrana plasmática y la

exocitosis de su contenido al exterior (Sussman et al., 1988; Hall et al., 1991), donde sólo las sub-unidades correctamente ensambladas (alrededor del 10% de las sintetizadas) alcanzarán su objetivo. Durante la construcción del complejo debe haber un exceso de cadenas, si bien ni todas son empleadas (algunas quedan retenidas en el RE y degradadas (Minami et al., 1987; Bonifacino et al., 1989), ni todas las ensambladas lo están de forma correcta (son desviadas en última instancia hacia lisosomas para su degradación; Aoe et al., 1993). Una correcta asociación del complejo TCR/CD3 en el retículo endoplásmico es indispensable para su correcta expresión en la superficie celular. Cuando esto no ocurre el receptor queda retenido en el RE y es degradado (Chen et al., 1988), asegurándose así que el receptor que sale a la superficie está correctamente plegado.

Una vez alcanzada la membrana plasmática, los complejos TCR/CD3 se pueden disponer en forma monovalente o bien formando agregados de TCR multivalentes en los que hay de 10 a 20 complejos (Schamel et al, 2005; Waters et al 2006). La multivalencia, como ocurre con las inmunoglobulinas, permite que la avidéz entre la interacción TCR/antígeno sea mucho mayor que lo esperado a tenor de la escasa afinidad monovalente (Schamel et al., 2006). La multivalencia tiene además otra ventaja, que es la capacidad de amplificar la pequeña señal de activación inicial mediante un mecanismo (hipotético) por el cual los TCR de un mismo nano-agregado verían facilitada su participación en la señalización al estar cerca de los que reconocen el antígeno, simplemente por su afinidad intrínseca por MHC. Para ello el ligando debe ser también multivalente, lo cual parece posible en el caso del MHC (Vogt et al., 2002). En este modelo, los TCR monovalentes sólo serían activados a altas concentraciones de antígeno, de manera que tendrían un papel en la inducción de la respuesta inmunitaria únicamente cuando la activación de los receptores multivalentes estuviera saturada, y explicaría el enorme rango de capacidad de respuesta de los linfocitos T indicado anteriormente. Este sería el caso del reconocimiento de autoantígenos en las enfermedades autoinmunitarias, lo que sugiere posibles aplicaciones terapéuticas.

I.2.5 Regulación

Una vez que el receptor se encuentra en la membrana, debe mantenerse un nivel de control constante que garantice que sólo los complejos correctamente ensamblados y funcionales son los que el linfocito T usa. El sistema de degradación intracelular ubiquitina-proteosoma, a nivel del RE, está implicado en la eliminación de aquellos complejos incorrectamente ensamblados (Yang et al., 1998).

Existe un equilibrio entre la internalización y el reciclaje del receptor que permite una expresión relativamente constante del complejo en la membrana. Esta situación de compromiso se rompe cuando la célula T encuentra el antígeno (o es activada *in vitro*), de tal modo que el nivel de expresión se modifica por cambios en los procesos que mantenían aquel equilibrio basal (Alcover et al., 2000) (Fig. I.9).

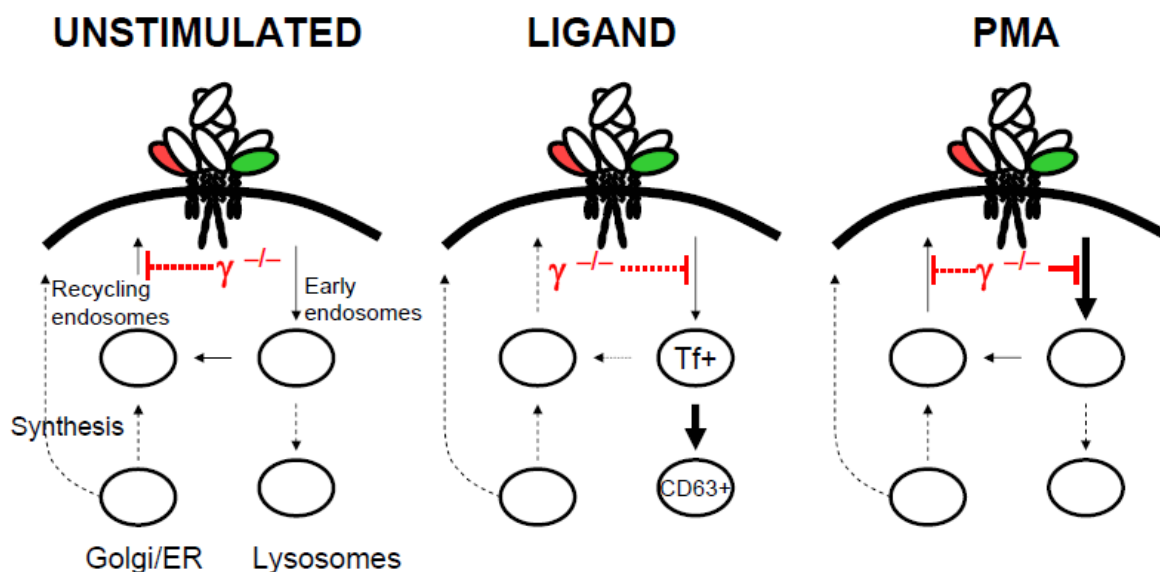


Fig. I.9. Esquema de la internalización del complejo TCR/CD3 en diferentes situaciones de estimulación. Contribución propuesta para la cadena CD3γ al tráfico del TCR en diferentes situaciones de activación (adaptado de Torres et al., 2003).

Los niveles constantes en la expresión de complejos TCR/CD3 en la membrana de las células T son resultado de un equilibrio entre procesos que reponen receptores a la superficie (síntesis / ensamblaje, y recirculación de los receptores internalizados) y aquellos que los

consumen (internalización, degradación y expulsión al medio extracelular). El encuentro de los receptores con sus respectivos ligandos supone, habitualmente, la modificación de los niveles de expresión del receptor (disminución) en la superficie celular. Este fenómeno se conoce como modulación del receptor (Alcover et al., 2000).

Al igual que ocurre con otros receptores transmembranales del sistema inmunitario (ej. BCR, FcR), el complejo TCR/CD3 no activado es constitutivamente internalizado con objeto de chequear el receptor expuesto, comprobar la incorporación de macromoléculas del exterior, modular el nivel de expresión de un receptor que ha recibido un estímulo, etc.

La internalización y el tráfico intracelular de los receptores precisa de una secuencia de aminoácidos que está presente en el tallo citoplasmático de algunas de las sub-unidades del receptor. Estas secuencias contienen motivos basados en residuos de tirosina, o en residuos de leucina (motivos dileucina) (Mellman et al., 1996; Kirchhausen et al., 1997). Como en el caso de otros receptores formados por varias sub-unidades, la internalización del complejo TCR/CD3 puede estar mediada por una o varias de ellas. En el caso concreto de este receptor las subunidades CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ y CD3 ζ contienen motivos basados en Tyr, presentes en sus regiones ITAM, y las cadenas CD3 γ y CD3 δ , contienen, además, un motivo dileucina (Letourner et al., 1992; Dietrich et al., 1994). El mecanismo molecular que media la internalización y el destino intracelular de los complejos TCR/CD3 internalizados (modulación) depende del estímulo aplicado:

- Modulación constitutiva: este proceso se cree que está mediado por la acción de serín-quinazas y serín-fosfatasa respectivamente, que actúan sobre la sub-unidad CD3 γ . Estos trabajos realizados en células T no activadas muestran que la fosforilación (complejo internalizado) y defosforilación (complejo en la superficie) del residuo Ser¹²⁶ de la cadena CD3 γ es crucial para este proceso. Así la fosforilación de la Ser¹²⁶ de CD3 γ mediada por la PKC (Boyer et al., 1991), expone el motivo dileucina (Leu¹³¹-Leu¹³²; también denominado de endocitosis), haciéndolo accesible a la maquinaria de endocitosis celular (Dietrich et al., 1994,

1996, 1997 y 1998). Mientras que la defosforilación de dicha Ser¹²⁶, por parte de la serín/treonín-fosfatasa 2-A, supone la re-expresión del complejo en la superficie celular.

- *Modulación inducida*: la interacción del TCR, ya sea con sus *ligandos naturales* (péptidos antigénicos) (Valitutti et al., 1995 y 1997; Hemmer et al., 1998; Itoh et al., 1999), con *anticuerpos monoclonales* (específicos de alguna de las diferentes cadenas TCR o CD3; Boyer et al., 1991; Niedergang et al., 1997; Luton et al., 1997; Lauritsen et al., 1998), o con *activadores farmacológicos* (como los ésteres de forbol), siempre induce la regulación a la baja de la expresión en superficie del TCR/CD3 (Reinherz et al., 1984; Cantrell et al., 1985). Este fenómeno perfectamente caracterizado, es considerado en la actualidad como un indicador de la señalización del propio complejo TCR/CD3.

El uso de *ésteres de forbol* como activadores farmacológicos de la PKC, permite inducir de manera artificial eventos propios de la activación fisiológica de la célula T, tales como la movilización de Ca²⁺ al interior celular, proliferación, o la fosforilación de la sub-unidad CD3 γ (Cantrell et al., 1987; Patel et al., 1987) con la consiguiente modulación del complejo TCR/CD3 (Zanders et al., 1983; Reinherz et al., 1984; Cantrell et al., 1985). El mecanismo molecular que subyace a este proceso de internalización mediado por ésteres de forbol es similar a los inducidos por la estimulación fisiológica (ej. antígeno), aunque con ciertas diferencias. La acción de los citados fármacos produce la internalización, como en estado constitutivo, mediada por la secuencia S¹²⁶DxxxL¹³¹L¹³² de la cadena CD3 γ , al activar la PKC que reconoce y fosforila la Ser¹²⁶ (Davies et al., 1987; Dietrich et al., 1994). Esta etapa depende, como ya se explicó anteriormente, de los aminoácidos adyacentes a la Ser¹²⁶ que exponen la secuencia de internalización DxxxLL, la cual interacciona con el complejo adaptador de clatrina (Dietrich et al., 1997) provocando la internalización y consiguiente retención en vesículas de reciclaje del complejo TCR/CD3 internalizado. Para que se produzca el viaje de vuelta a la membrana plasmática es necesaria la defosforilación de la Ser¹²⁶ (Dietrich et al., 1998).

Este proceso de internalización también puede ser mimetizado mediante el entrecruzamiento con *anticuerpos monoclonales* específicos de las cadenas TCR o CD3. En este caso, la activación del complejo implica una rápida internalización y posterior degradación en el

compartimento lisosomal (Telerman et al., 1987) o retención en el interior celular (Liu et al., 2000). En definitiva este proceso mediaría dos funciones distintas en la activación de la célula T: por un lado facilitar la señal de activación y por otro atenuar la estimulación de la célula T (Di Fiore et al., 1999).

I.2.6 Función

El complejo TCR/CD3 es crucial para el linfocito T en dos momentos muy diferentes de su vida, el primero durante la selección intratímica y el segundo, en la respuesta adaptativa en la periferia.

a) En el timo

Las células T de un individuo que alcanzan la periferia (repertorio útil) son el fruto de un estricto proceso de selección que sufren todas las células producidas. Así, la mayoría de estas células serán eliminadas durante el proceso de selección (positiva y negativa) garantizando la fiabilidad (afinidad/especificidad adecuadas) de los linfocitos que van a formar el repertorio T. Estos procesos de selección comprueban cómo es y cómo se comporta el complejo TCR/CD3 para asegurar su eficacia, y sin comprometer la integridad de lo “propio” (fenómenos de autoinmunidad).

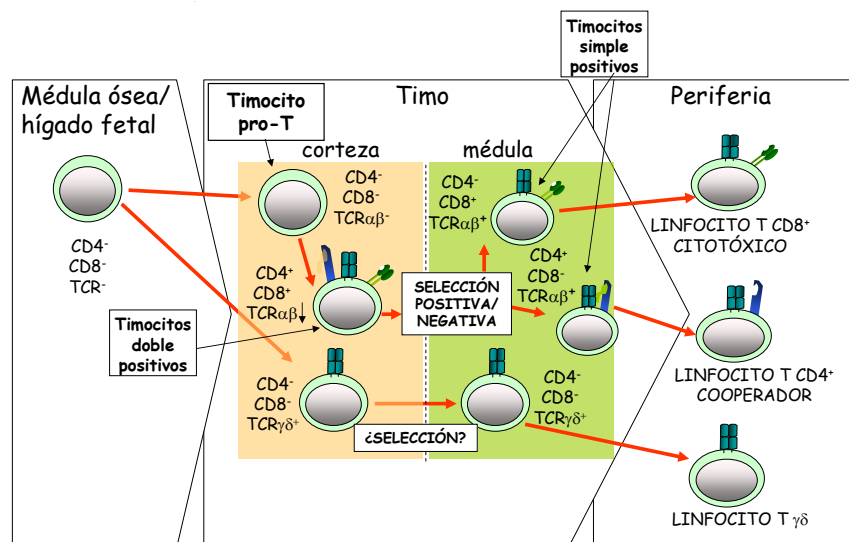


Fig. I.10. Esquema del desarrollo del linaje T. Proceso del desarrollo de la célula T desde la médula ósea hasta alcanzar la periferia.

- Diferenciación y selección tímica (selección positiva y negativa).

Durante el desarrollo en el timo, la célula que quiere convertirse en linfocito T ensambla y expresa un complejo (pre-TCR) que contiene todos los elementos estructurales del complejo TCR maduro, excepto la cadena $\text{TCR}\alpha$, que es reemplazada por una cadena invariable ($\text{pT}\alpha$) (von Boehmer, 1997).

Inicialmente, cuando el timocito está reordenando su cadena $\text{TCR}\beta$ (genes RAG1 y RAG2 activos), $\text{pT}\alpha$ actúa facilitando un marco adecuado para chequear la productividad de dicho reordenamiento. De tal modo que las cadenas $\text{TCR}\beta$ incapaces de asociarse a $\text{pT}\alpha$ son inmediatamente descartadas. Por su parte los timocitos pre-TCR^+ con cadenas $\text{TCR}\beta$ aptas progresarán de dobles negativos (DN , $\text{CD4}^- \text{CD8}^-$) a dobles positivos (DP , $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$). A continuación, el pre-TCR permite la expansión de las células que reordenaron correctamente y la inactivación de los genes RAG1 y RAG2 . Al final de la expansión, los genes RAG1 y 2 se reactivan y se produce el tránsito hacia células DP , momento en el cual los transcritos de la cadena $\text{TCR}\alpha$ empiezan a ser detectables. Posteriormente se ensamblan las cadenas $\text{TCR}\alpha$, los timocitos paran la expresión de $\text{pT}\alpha$ y los loci RAG1 y RAG2 , y comienzan los procesos de selección (positiva y negativa). Los TCR son testados en términos de afinidad/avidez, por las células tímicas estromales mediante sus moléculas MHC-I y II . En primer lugar se seleccionan los timocitos que reconocen MHC-I y II propias cargadas con antígenos propios (selección positiva); posteriormente son eliminados aquellos timocitos que reconocen los mencionados péptidos propios con muy poca o ninguna (falta de selección positiva), o demasiada afinidad (selección negativa).

El proceso descrito permite que células indiferenciadas, no comprometidas hacia ningún linaje celular, pasen a ser precursores de células T. Los timocitos DP generados se convierten en células simples positivas (SP , CD4^+ o CD8^+) y finalmente en linfocitos T maduros, de modo que todas las etapas y mecanismos implicados serían universales e independientes del fenotipo final. Que unas cadenas estén asociadas a los complejos pre-TCR y otras no (Groettrup et al., 1992; Shinkai et al., 1993; Jacobs et al., 1994), sugiere un papel diferencial en las etapas iniciales del desarrollo para estas proteínas. Importancia que difiere además según el modelo estudiado, humano o ratón, como se desprende de los datos obtenidos del estudio de estas raras deficiencias en sendos modelos. Cabe mencionar en este punto el reciente hallazgo hecho en ratón sobre la existencia de un factor genético que influye sobre la proliferación de los precursores tímicos (en

el estadio de DN4) y que condiciona de manera determinante el desarrollo en el timo (Dulude et al., 2008).

b) En la periferia

Una vez que el timocito supera todos los procesos de selección, se convierte en un linfocito T maduro ($CD4^+$ o $CD8^+$) capaz de ejercer su función. Es a partir de este momento cuando el TCR/CD3 puede ser requerido por segunda vez en la vida de esta célula. En su devenir por la periferia el receptor constituye la principal herramienta de interacción con el entorno. En su encuentro con el antígeno, la adecuada activación del linfocito T supone la puesta en marcha de toda una compleja maquinaria, a saber: transcripción y/o bloqueo de genes, inducción de la proliferación, ejecución de funciones efectoras o inducción de anergia/apoptosis (Malissen et al., 1993 y 1999; Imboden et al., 1995).

El sistema de reconocimiento de antígeno del linfocito T se diferencia de otros del sistema inmunitario por la cantidad de interacciones moleculares que lo acompañan (Fig. I.11) (Bierer y Bukarof, 1989; Matsui et al., 1991):

- 1) Se produce la actuación de un conjunto de moléculas denominadas accesorias implicadas en la unión de las dos células que interaccionan (Delon et al., 1998).

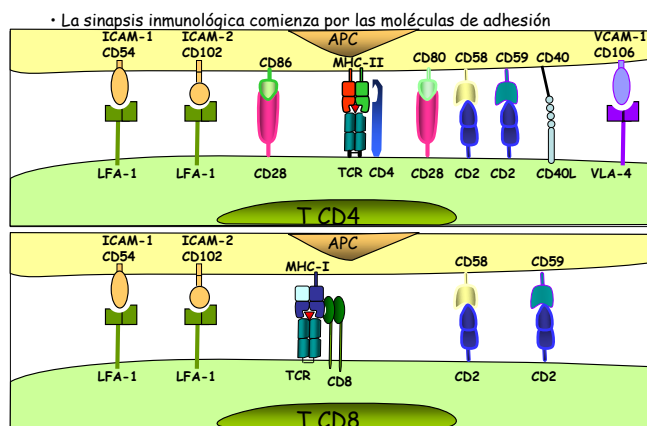


Fig. I.11. La sinapsis inmunitaria. Esquema en el que se representan algunas de las moléculas que intervienen en la sinapsis inmunitaria.

- 2) En esta situación se procede a la inspección antigénica de tal modo que si no existe reconocimiento, bien por ausencia o bien por bajas concentraciones de antígeno, la célula T se separa de la diana sin sufrir cambios (Delon et al., 1998). Si por el contrario se produce

reconocimiento específico, el complejo TCR/CD3 comienza a emitir señales de activación (o inhibición) al interior celular, intensificándose la adhesión inicial.

3) Se produce una agregación local de proteínas accesorias en la zona de reconocimiento, a través de moléculas tales como CD28, CD2 ó LFA-1 (Davis et al., 1998), CD43 (Rosenstein et al., 1991) y especialmente los correceptores CD4 y CD8 (Hara et al., 1991), que interaccionan también con la molécula de histocompatibilidad presentadora (aunque a través de regiones conservadas). Muchas de estas moléculas accesorias se encuentran asociadas directa o indirectamente a proteínas con actividad tirosina quinasa o fosfatasa y, aunque no se conozcan con precisión todas las señales de activación/inhibición que pueden emitir, es posible que el linfocito T utilice estas moléculas para identificar o seleccionar a su interlocutor celular mientras inspecciona sus moléculas de histocompatibilidad y decide cual va a ser su respuesta.

4) La activación del linfocito T, mediada por el complejo TCR/CD3, va acompañada de un profundo cambio en su morfología (Serrador et al., 1999), que implica la reorganización dinámica de su citoesqueleto para contactar con otros componentes de la cascada de transducción de la señal más distales.

5) La señal de activación de la célula T necesita recurrir a las anteriormente mencionadas secuencias ITAM del complejo CD3. Con ellas se reclutan y activan (mediante fosforilación) a una serie de tirosín-quinazas citosólicas, tales como Lck, Fyn, Zap-70, Itk, y de adaptadores transmembranales (ej. TRIM, LAT) y citoplásmicos (SLP-76, Grb2, Gads) que permiten un gran control sobre la señal original (ej. amplificación o diversificación de la señal; Kane et al., 2000).

6) La acción orquestada por todos los citados elementos señalizadores induce la activación de factores de transcripción que permiten la expresión de genes responsables de la proliferación, diferenciación y activación celular (Jacinto et al., 1998). Entre algunos de estos genes destacan los *marcadores de activación* (expresados a las 2-6 h como CD69) que nos permiten monitorizar en que estado se encuentra la célula (Sánchez-Mateos et al., 1991) o bien para transmitir la activación a terceros (CD154; Yang y Wilson, 1996). Otros de inducción algo más tardía y de vital importancia son los genes de *citocinas* (ej. IL-2), indispensables para la coordinación de la respuesta inmunitaria. En última instancia, cronológicamente aparecen los genes responsables, entre otros fenómenos, de la expansión clonal, la producción de moléculas "tóxicas" (tipo perforinas) para la eliminación de patógenos intracelulares (en el caso de los linfocitos T citolíticos), o incluso aquellos encargados de detener la respuesta, como son los genes de apoptosis.

I.2.7 Evolución

La evolución del TCR está estrechamente relacionada con la evolución del sistema inmunitario de los vertebrados. Así, en 500 millones de años se han ido añadiendo órganos y tejidos con diversas funciones inmunitarias en la escala filogenética de vertebrados, desde los peces sin mandíbula (*Agnatha*) hasta las aves y mamíferos (Pancer y Cooper, 2006). De esta forma, si bien todos los vertebrados tienen tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), y la mayoría cuenta con alguna versión de bazo y timo, no todos poseen médula ósea o ganglios linfáticos para formar células sanguíneas, ni todos comparten la capacidad para formar centros germinales. La diferencia que se observa en los órganos y tejidos también se refleja en los componentes celulares. Por esta razón se cree que la aparición de los linfocitos T y su TCR está directamente relacionada con la aparición del timo en los vertebrados. Hasta la fecha no se ha demostrado la presencia de linfocitos T o su TCR (ni tampoco linfocitos B, BCR, inmunoglobulinas, MHC, recombinasas u otras moléculas relacionadas con la inmunidad adaptativa) en los peces sin mandíbula ni en los invertebrados. En cambio en los vertebrados con mandíbula (*Gnathosomata*), representado por los peces cartilaginosos (tiburones, mantarrayas), se produce un gran salto cualitativo en la escala filogenética con respecto a la organización genómica de los genes que codifican los receptores antigénicos pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Es por ello que los vertebrados (excepto los *Agnatha*) presentan elementos celulares más evolucionados (*linfocitos T y B*), con receptores específicos en su membrana, que van a permitir el reconocimiento de una gran diversidad de estructuras antigénicas, con capacidad para recordar exposiciones previas (memoria) y de responder de forma más efectiva en posteriores exposiciones al mismo antígeno (maduración de la respuesta) (Acton et al. 1969; Suzuki et al. 2004). A pesar de que se asocia la aparición de los linfocitos con la presencia del timo en los vertebrados, se desconoce exactamente durante la evolución cuándo aparecieron los linfocitos como un tipo especializado de células inmunocompetentes. En cualquier caso, solamente se han podido encontrar células comparables en los vertebrados superiores y nunca se han podido caracterizar en invertebrados.

En cuanto a las cadenas CD3, como se vio con anterioridad, todas a excepción de ζ , se encuentran muy próximas en el brazo largo del cromosoma 11 (en humanos). Este hecho se debe probablemente a un fenómeno de duplicación génica que ha llevado en la evolución a la

distinción de estas proteínas (Gouaillard et al., 2001). En el caso de CD3 γ y δ encontramos un gen precursor común a ambas en la filogenia, presente en anfibios, peces y aves, llamado CD3 γ/δ (Fig I. 12), lo cual nos da una idea de lo próximos y solapantes que pueden llegar a ser sus funciones.

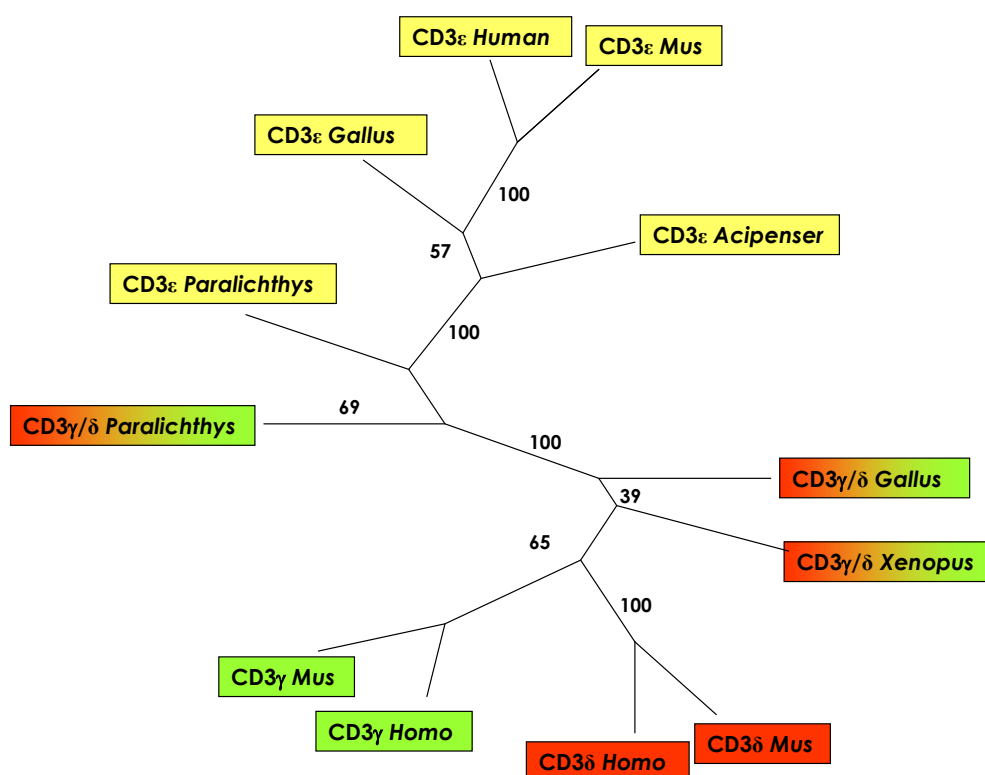


Fig. I.12. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ y CD3 γ/δ . Las distancias filogenéticas se calculan mediante la técnica de “neighbor-joining”. Los géneros analizados son: Homo (humano), Mus (ratón), Gallus (pollo), Xenopus (rana), Acipenser (esturión) y Paralichthys (lenguado japonés). Adaptado de Park et al., 2005.

I.2.8 Deficiencias descritas en humanos y modelos animales

Las inmunodeficiencias debidas a defectos en la expresión de CD3 son patologías del tipo $T^-B^+NK^+$ con muy baja prevalencia, caracterizadas por un defecto de expresión del TCR, frecuentemente acompañado de linfopenia T en sangre periférica, inmunodeficiencia combinada grave y/o signos de autoinmunidad. Regueiro y col. descubrieron en 1986, y caracterizaron unos años después (Arnaiz-Villena, 1992), la primera de ellas: una deficiencia completa de CD3 γ . Desde entonces se han descrito casos de inmunodeficiencias en todas las cadenas CD3. Dichas patologías pueden ser clasificadas en completas si la ausencia de dicha cadena es total o parciales si se detectan niveles residuales de la proteína afectada (Marin et al., 2015).

El fenotipo observado es diverso, en función de la cadena que se encuentre deficiente, de manera que podemos encontrar un espectro de fenotipos de más graves a más moderados. Este último hecho nos da una idea de la heterogeneidad funcional que deben desempeñar las cadenas CD3 como componentes del TCR dentro de la fisiología del linfocito T (Fischer et al, 2005; Recio et al. 2007). Por esta razón y para comprender mejor el funcionamiento de estas cadenas en el complejo, se ha optado por trabajar con muestras de estos pacientes y sus familiares portadores de la mutación en esta tesis doctoral. De esta manera, la identificación de los fenómenos ocurridos cuando alguna de las cadenas sea limitante nos permitirá conocer con mayor precisión los mecanismos implicados en el desarrollo y función del linaje T.

A modo de resumen de estas patologías hay que destacar que la cadena en la que más casos se han descrito es CD3 δ , con 19 pacientes diagnosticados procedentes de 10 familias distintas y cuatro tipos de mutaciones secuenciadas, tres de ellas completas (c.202 C>T, c.279 C>A y c.IVIS2-2A>G) y una de tipo parcial (c.IVIS2+5G>A) (Dadi et al., 2003; de Saint Basile et al., 2004; Takada et al., 2005; Le Deist et al., 2007; Marcus et al., 2011 y Gil et al., 2011). En el caso de mutaciones de CD ϵ , se han descrito 4 mutaciones diferentes en tres familias. Tres tipos de mutación fueron completas (c.230A>G, c.128_129del; c.IVS2+1G>C; Soudais et al., 1993; de Saint Basile, 2004; Fuehrer, 2014) y una parcial (c.IVS7+2T>C; Soudais et al., 1993). Los pacientes con patologías debidas a deficiencias en *CD3D* o *CDE* presentan clínica de SCID muy acusada en la que se hace indispensable un trasplante de células madre hematopoyéticas, ya que de lo contrario fallecen a edad temprana como consecuencia de infecciones virales por citomegalovirus en su mayoría, pero también por adenovirus.

La deficiencia de CD3 γ por su parte se debe a tres mutaciones posibles (c.205 A>T, c.1A>G, c.IVS2-1G>C). Se han encontrado diez pacientes hasta la fecha (Regueiro et al., 1986; Arnaiz-Villena et al., 1992; Sanal et al. 1996; Van Tol et al., 1997; Recio et al., 2007; Ozguz et al., 2008; Tokgoz et al., 2013; Gokturk et al., 2014) procedentes de cinco familias distintas; tres de los cuales fallecieron a pesar del trasplante de precursores hematopoyéticos. En el caso de deficiencia de CD3 γ , muchos pacientes presentan anemia hemolítica autoinmune o vitíligo (Arnaiz-Villena et al., 1992), así como tiroiditis autoinmunes, trombocitopenia o hepatitis autoinmunes (Gokturk et al., 2014). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con lo reportado para el resto de deficiencias de CD3, en siete de los diez casos de deficiencia de CD3 γ no ha sido necesario un trasplante y en la actualidad los pacientes están vivos, superando algunos la treintena. Esto demuestra que CD3 γ no es tan crítica para la supervivencia en comparación con otras cadenas, en especial con CD3 δ que es con la que tiene mayor homología. La explicación más plausible es la capacidad de CD3 δ para sustituir a CD3 γ cuando ésta está ausente (Zapata et al., 2004), mientras que lo contrario parece no ocurrir.

Por otra parte, la deficiencia de CD247 o ζ se ha descrito con dos tipos de mutación distintas (c. 207C>T y c.411insC). La primera de las mutaciones se encontró en un paciente con un complejo caso de deficiencia de CD247, corregido por mutaciones somáticas y con fenotipo clínico de infecciones recurrentes y bajo número de células T en periferia (Rieux-Laucat et al., 2006). El otro caso se trata de deficiencia de CD247 completa con infecciones recurrentes y trombocitopenia, que ha tenido que ser tratada con tres trasplantes de precursores hematopoyéticos por el fracaso de los dos primeros intentos (Roberts et al., 2007). La deficiencia de TCR α con una mutación c.*1G>A se presenta con vitíligo, anemia hemolítica autoinmune o autoanticuerpos, y requiere de trasplante de precursores hematopoyéticos (Morgan et al., 2011).

	Familia	Número de Pacientes	Origen	Mutación
CD3 γ	1	2	Turquía	c.205 A>T
	2	1	Turquía	c.205 A>T
	3	2	España	c.1A>G + c.IVS2-1G>C
	4	2	Turquía	c.IVS2-1G>C
	5	3	Turquía	c.IVS2-1G>C
CD3 δ	1	5	Menonitas	c.202 C>T
	2	1	Menonitas	c.202 C>T
	3	1	Menonitas	c.202 C>T
	4	3	Menonitas	c.202 C>T
	5	2	Francia	c.279 C>A
	6	1	Francia	c.279C>A
	7	3	Japón	c.IVIS2-2A>G
	8	1	Ecuador	c. IVS2+5 G>A
	9	1	Ecuador	c. IVS2+5 G>A
	10	1	Ecuador	c. IVS2+5 G>A
CD3 ϵ	1	1	Francia	c.IVS7+2T>C + c.230 G>A
	2	3	Francia	c.128_129del
	3	1	Alemania	c.IVS2+1G>C
CD247 (ζ)	1	1	Caribe	c. 207C>T
	2	1	Hawaii	c.41 linsC
	3	1	Turquía	c. 207C>T
TCR γ	1	1	Paquistán	c.*1G>A

Tabla I.3. Mutaciones en el complejo TCR/CD3 encontradas en los pacientes diagnosticados hasta el momento.

Además de los pacientes deficientes para estas cadenas otro modelo de estudio del complejo TCR/CD3 con limitación de sus componentes son los modelos animales, principalmente en ratones (Mazariegos et al., 2013). Estos ratones knock-out (KO) se usan como réplica de deficiencias de TCR humanas, ya que ambas especies comparten gran homología en las secuencias de los componentes del complejo, así como también homología funcional (Dave et al., 2009). Además, el estudio de ratones con mutaciones en los genes que codifican las cadenas invariantes y variables de TCR ha contribuido a la caracterización del papel de cada cadena (Malissen et al. 1999, Moombaerts et al. 1992).

Existen ratones con mutaciones para todas las cadenas variables e invariantes del complejo, tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Cadena TCR/CD3 ausente	Autor del modelo
CD3 γ	Haks et al. 1998
CD3 δ	Dave et al. 1997
CD3 ϵ	Malissen et al. 1995
	deJarnette et al. 1998
	Wang et al. 2009 (Deficiencia parcial)
CD3 γ + CD3 δ	Wang et al. 1998
TCR α	Moombaerts et al.1992
TCR β	Moombaerts et al.1992

Tabla 1.4. Modelos de ratones KO y doble KO para los componetes del TCR/CD3.
Adaptada de Marin et al., 2015.

Los análisis en ratones sugieren que, en ciertos aspectos, los requerimientos de dichas cadenas son diferentes en las dos especies, tal y como explicamos en el apartado I.2.3 de esta introducción y como trataremos más adelante en la discusión. Estas diferencias establecen limitaciones en cuanto al uso de modelos de ratones para la obtención de información relevante en el contexto de las deficiencias humanas del TCR. Una manera de solventar este problema ha

sido la generación y análisis de ratones «humanizados» portadores de cadenas TCR (Pasare et al., 2001) o CD3 transgénicas de origen humano (Dave et al., 1997; de la Hera et al., 1991; Pan et al., 2005; Fernández-Malavé et al., 2006).

I.2.9 Haploinsuficiencias

El estudio de individuos portadores de mutaciones de carácter recesivo en heterocigosis no ha sido hasta el momento objeto de gran interés, ya que son individuos aparentemente sanos. Incluso han sido usados en numerosas ocasiones a modo de controles sanos en el caso de familiares de enfermos con mutaciones en homocigosis. No obstante, en la literatura se describen ciertos hallazgos en individuos heterocigotos para mutaciones que afectan al sistema inmunitario. Tal es el caso de los individuos heterocigotos para una mutación autosómica recesiva en *ORAI1*, causante de Inmunodeficiencia Combinada Grave (Feske et al., 2010), los cuales muestran un fenotipo intermedio en distintos aspectos (como por ejemplo el flujo de Ca^{2+}) entre individuos deficientes y controles sanos.

Otro caso reseñable es el de la deficiencia de adenosín desaminasa (ADA), de herencia autosómica recesiva, donde los familiares (padres y hermanos) portadores en heterocigosis de la mutación patogénica mostraban una disminución en la actividad de ADA (Oda et al., 2000), pero en ausencia de alteración clínica alguna. Un año después, el mismo grupo de investigadores obtuvo resultados similares en portadores de otras mutaciones para esta enzima. Así, en una de las familias analizadas la actividad de ADA en células primarias (granulocitos y eritrocitos) estaba reducida a la mitad en comparación con controles suficientes; inesperadamente la actividad de ADA en los mismos tipos celulares de la madre y un hermano, ambos sanos y con niveles normales de linfocitos en sangre, era tan baja como en las células del paciente deficiente (Ariga et al., 2001).

Este tipo de situación no sólo se ha visto en humanos sino también en modelos de ratón, como es el caso de la deficiencia de *JAK3* causante de inmunodeficiencia combinada grave y de enfermedad inflamatoria intestinal. Otra de las mutaciones que ocasiona esta patología se

encuentra en la proteína tirosín fosfatasa de células T (TC-PTP/PTPN2), una enzima que participa en el control de la proliferación celular y la inflamación. Los ratones homocigotos para mutaciones en el gen codificante de esta enzima presentan varias inmunodeficiencias, hipersensibilidad al LPS y mueren alrededor de las tres semanas, de anemia e inflamación sistémica. Curiosamente, los ratones heterocigotos, si bien sobreviven, presentan distintas alteraciones como colon inflamado o incremento de los niveles de mRNA de distintas citocinas. Por tanto, los autores concluyeron que una sola copia del gen mutado era suficiente para tener mayor predisposición a inflamación sistémica (Hassan et al., 2010).

Siguiendo con las inmunodeficiencias de células T, pero en este caso adquiridas, también se ha observado que la haploinsuficiencia es relevante en el contexto de la infección por VIH. Es el caso de los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4 que utiliza el virus como co-receptor para entrar en sus células diana (linfocitos T y monocitos) (Dunkan et al., 2005). Se han descrito distintas mutaciones en estos correceptores, siendo la más conocida una delección de 32 pb (CCR5 Δ 32), que en heterocigosis confiere cierto grado de protección frente a la infección. Otros estudios han demostrado también que en individuos infectados dicha mutación se asocia a una progresión lenta de la enfermedad (van Manel et al., 2011).

En el caso de deficiencias del linaje B, cabe destacar el caso de la Inmunodeficiencia Común Variable (CVID en su acrónimo en inglés) y el déficit de IgA, donde los pacientes presentan mutaciones en *TACI* (*Transmembrane activator and CAML interactor*) y muestran una disfunción en la producción de anticuerpos. Tras comprobar la presencia de las mutaciones de *TACI* en los pacientes, los investigadores encontraron que todos ellos tenían familiares con las mismas mutaciones. De hecho, 11 de los 12 familiares identificados con mutaciones en *TACI* en heterocigosis presentaban un historial de infecciones recurrentes asociado a niveles bajos de IgA o IgG, o de ambas inmunoglobulinas (Castigli et al., 2005; La Cava, 2013).

II. Hipótesis y objetivos

II.1 Hipótesis

Aunque hasta el momento no se han descrito características significativas a nivel funcional o patológico en los individuos haploinsuficientes para CD3, partimos de la hipótesis de que la haploinsuficiencia de CD3 puede tener un impacto en la expresión y función del TCR, que a su vez puede ser relevante en el desarrollo de los linfocitos T y en la inmunidad mediada por estas células.

II.2 Objetivo general

Estudio de las consecuencias de la haploinsuficiencia de CD3 (CD3 γ y CD3 δ) en la expresión y función del TCR/CD3 en humanos y modelos de ratones.

II.2 Objetivos particulares

- a) Analizar la expresión del complejo TCR/CD3 en individuos haploinsuficientes para CD3.
- b) Comparar la expresión de los complejos TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ en los individuos haploinsuficientes.
- c) Estudiar los efectos de la haploinsuficiencia de CD3 en el desarrollo en el timo de los linfocitos T.
- d) Caracterizar los efectos de la haploinsuficiencia de CD3 sobre la funcionalidad del complejo TCR/CD3 en linfocitos T maduros.

III. Material y métodos

III.1 MATERIAL BIOLÓGICO: MUESTRAS HUMANAS

III.1.1 Pacientes, familiares y controles

Las células T humanas empleadas proceden de familias diagnosticadas de deficiencia congénita de CD3. Tres de las familias con deficiencia de CD3 γ y dos con deficiencia de CD3 δ (Fig. III.1). Todas estas muestras han sido cedidas amablemente por los doctores de los hospitales de referencia (tabla III.1), aprovechando las extracciones que se le practican regularmente para su seguimiento clínico e inmunológico, o bien *ex profeso* para este trabajo a modo de colaboración. Adicionalmente, se tomaron muestras procedentes de individuos sanos (CD3 $\gamma^{+/+}$) como controles para estos experimentos.

	FAMILIA	MUTACIÓN	ORIGEN	INVESTIGADOR RESPONSABLE	CONTACTO
CD3 γ	1	c.[1A>G]+[80-1G>C]	Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid, España	Dr. Luis Allende	lallende.hdoc@salud.madrid.org
	2	c.205A>T	Hacettepe University Children's Hospital. Ankara, Turquía	Dr. Orden Sanal	sanaloz@yahoo.com
	3	c.205A>T	Uludag University Medical Faculty. Görükle-Bursa, Turquía	Dr. Sara S. Kilic	sebnemkl@uludag.edu.tr
CD3 δ	4	c.202C>T	Hospital for Sick Children Toronto, Canadá	Dr. Chaim M. Roifman	chaim.roifman@sickkids.ca
	5	c. IVS2-2A>G	Grad. School of Medical Sciences. Kyushu University Fukuoka, Japón	Dr. Hidetoshi Takada	takadah@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp

Tabla III.1. Datos de contacto de colaboradores que han cedido muestras de pacientes y portadores con mutaciones en CD3.

Cuando se trate de pacientes, los denominaremos en adelante $\gamma^{-/-}$ (o $\delta^{-/-}$), cuando se trate de familiares heterocigotos usaremos $\gamma^{+/-}$ o $\delta^{+/-}$, independientemente de la mutación. Su historia clínica, así como sus características inmunológicas han sido descritas ya previamente y de forma amplia en la literatura, y han quedado resumidas en la introducción. Los individuos analizados en este trabajo se señalan en los árboles familiares presentados a continuación:

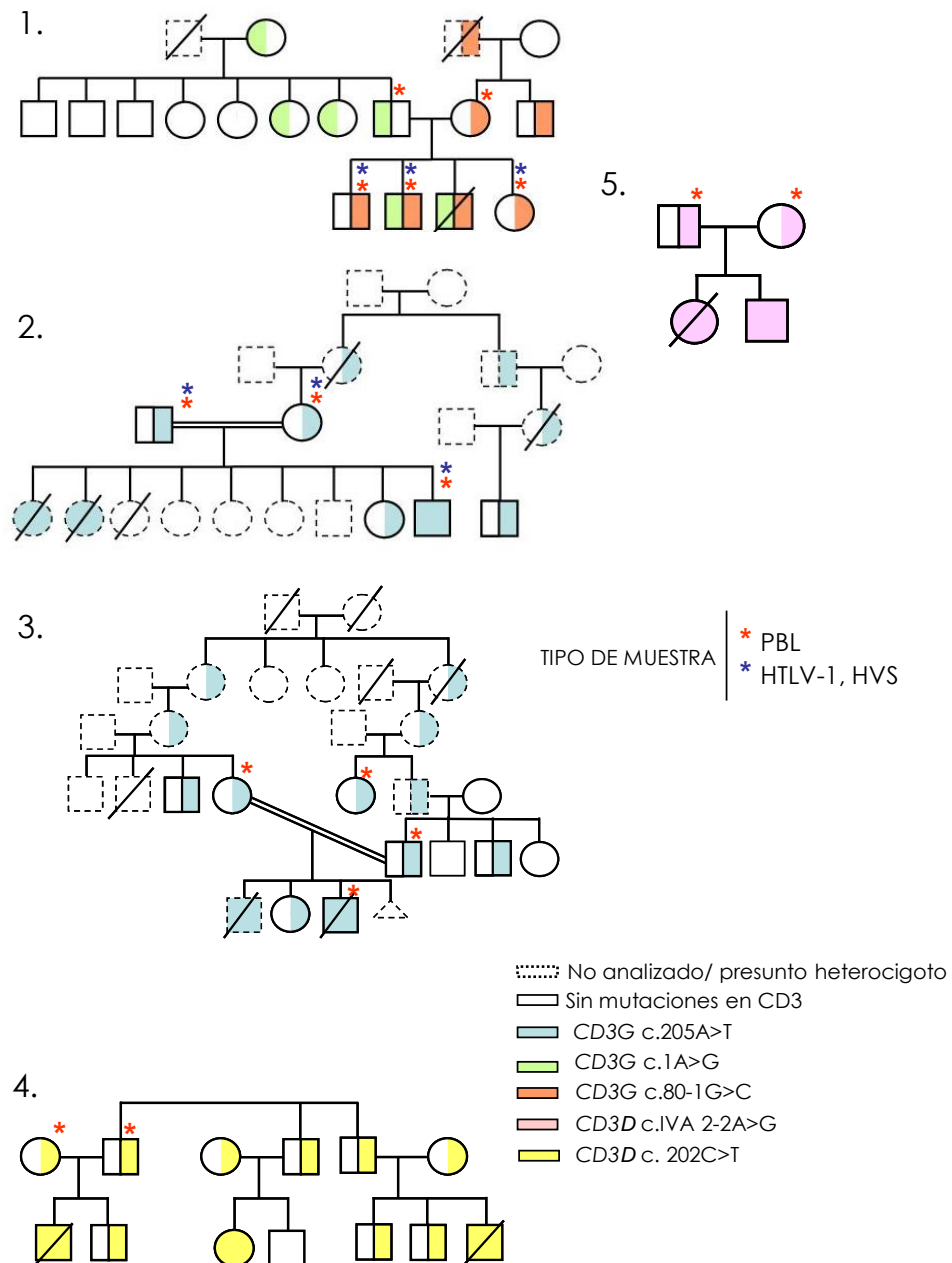


Fig. III.1. Árboles genealógicos de las cinco familias analizadas. Las familias están numeradas según la tabla III.1. Con asteriscos se indican los individuos analizados, en rojo si se han analizado PBL, y en azul si se han usado líneas transformadas.

III.1.2 Aislamiento de linfocitos T primarios

Los linfocitos se aislaron a partir de muestras de sangre extraída por punción venosa en heparina o EDTA. Se procedió al aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBL) mediante el protocolo de centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque Lymphoprep, Nyegaard) siguiendo las condiciones del fabricante (700g, 45 min, temperatura ambiente).

El rendimiento habitual de esta técnica para las células control y heterocigotos varía entre $0.8-1 \times 10^6$ linfocitos de sangre periférica/ml de sangre total. Respecto a las muestras de los individuos deficientes procesadas en paralelo con las control, se obtienen de $0.5-0.8 \times 10^6$ células PBL/ml de sangre total, reflejo inicial de la linfopenia de estos individuos.

Las células se crecieron en medio de cultivo completo RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 80 U.I de rhIL2 (Tecin-Teceleukin, donada por Hoffmann La Roche Inc, Nutley, NJ, USA), 20% FCS (Flow laboratories), 1% antibiótico (Gibco) y 1% glutamina (BioWhitaker), con estimulaciones quincenales de PHA+ IL-2 durante el periodo de cultivo.

III.1.3 Líneas transformadas de linfocitos T

En el laboratorio teníamos disponibles líneas de linfocitos T transformadas con *Herpesvirus saimiri* (HVS) o con el virus linfotrópico T humano tipo 1 (HTLV-1), procedentes de individuos $\gamma^{+/+}$, $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$. Estas líneas, generadas con anterioridad a este trabajo, han sido estudiadas en detalle y se ha comprobado que el fenotipo de las células T no varía (Rodríguez-Gallego et al., 1996; Alvarez-Zapata et al., 1998; Rivero-Carmena et al., 2000; Cabanillas et al., 2002; Gallego et al., 1997; Broker et al., 1997; Altare et al., 1998; Allende et al., 2000; Nakamura et al., 2001; García-Pérez et al., 2003; Martín-Fernandez et al., 2005).

Las células inmortalizadas se crecieron en medio de cultivo completo Panserin (FontLab): RPMI (Gibco) (proporción 1:1), suplementado con 80 U.I de rIL2 (Tecin-Teceleukin, donada por Hoffmann La Roche Inc, Nutley, NJ), 10% FCS (Flow laboratories), 1% antibiótico (Gibco) y 1% glutamina (BioWhitaker).

III.2 MATERIAL BIOLÓGICO: MUESTRAS DE RATÓN

III.2.1 Ratones

Se utilizaron ratones C57BL/6 (en adelante b6 o +/+), así como ratones knock out (KO) para las distintas cadenas CD3. Los ratones deficientes de CD3 γ ($\gamma^{-/-}$) habían sido generados en 1998 por el grupo de A.M Kruisbeek (Hacks et al. 1998), y nos fueron amablemente cedidos por el Dr. D Kappes. Por su parte, los ratones deficientes de CD3 δ ($\delta^{-/-}$) habían sido generados por el Dr. D. Kappes (Dave et al., 1997) y nos fueron cedidos por el Dr. Immanuel Luescher (Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne, Suiza).

Los ratones heterocigotos objeto de este estudio se obtuvieron cruzando hembras b6 bien con machos KO CD3 $\delta^{-/-}$ o bien con machos CD3 $\gamma^{-/-}$, de 4 a 6 semanas de edad.

En todos los casos los ratones se mantuvieron separados por genotipo y sexo en el Animalario de la Universidad Complutense de Madrid (CC. Biológicas) hasta su procesamiento, mientras tanto, se proporcionó agua y una dieta *ad libitum* de composición normal para roedor.

III.2.2 Procesamiento de órganos

Los animales de 4 a 12 semanas de edad fueron sacrificados y a continuación se les extrajo timo, bazo y los ganglios linfáticos, manteniendo condiciones de esterilidad. La sangre por su parte se obtuvo del seno retro-orbital y fue dispensada en tubos con heparina como agente anticoagulante.

Los diferentes órganos se colocaron en PBS estéril, donde fueron macerados y pasados a través de una malla de 70 μm con el fin de eliminar agregados. Tras lavar de nuevo con PBS estéril, las células de timo y de ganglios estaban listas para su uso y por lo tanto podían ser contadas. En el caso de los esplenocitos, hubo que lisar los eritrocitos presentes utilizando la solución de lisis ACK (0.15 M NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM Na_2EDTA , pH 7.2) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

En el procesamiento de la sangre, los PBL de ratón se extrajeron de forma similar a los humanos pero usando un reactivo para la separación por gradiente de densidad adecuado (Lympholyte-M, Cederlane).

III.3 EVALUACIÓN FENOTÍPICA

III.3.1 Citometría extracelular

a. Tinciones extracelulares

La estrategia de tinción extracelular fue similar para las células humanas (primarias y transformadas) y para las de ratón. En ambos casos las células se lavaron dos veces con PBS-1%BSA y se resuspendieron a una concentración final de 1×10^6 células/ml en la misma solución, para posteriormente dispensar 200 μl de dicha suspensión en pocillos de una placa de 96p con fondo en V (*Iwaki*). A continuación se centrifugaron las placas a 1500 rpm durante tres minutos y a 4°C, y se eliminó

finalmente el sobrenadante. Posteriormente se añadieron a cada pocillo las cantidades adecuadas del correspondiente anticuerpo monoclonal o antisuero, se resuspendieron las células cuidadosamente en un volumen final de 100 μ l, y se incubaron de este modo durante 20-30 minutos a 4°C y protegidas de la luz. Tras la reacción de marcaje y para los anticuerpos previamente conjugados con un fluorocromo –FITC o PE-, las células se lavaron otras 2 veces con PBS-1% FCS, se resuspendieron en 500 μ l de PBS-1% formaldehído y se analizaron por citometría de flujo.

En el caso de anticuerpos/antisueros no conjugados, tras la reacción de marcaje, las células se lavaron 2 veces en PBS-1% BSA y se incubaron en presencia de un segundo anticuerpo (de cabra) conjugado con FITC o PE (Immunotech). Dicho anticuerpo dirigido contra la porción Fc del primer anticuerpo utilizado, se incubó durante 20 minutos a 4°C y protegido de la luz. Si los anticuerpos primarios estaban biotinilados (como ocurrió en alguna de las tinciones de ratón) tras los dos lavados con PBS-BSA se incubó las células con estreptavidina conjugada con FITC, PE o PeCy5 en función de las necesidades; esta incubación también era de 20 minutos, a 4°C y en oscuridad. Finalmente las células se lavaron dos veces con PBS-1%BSA y se resuspendieron en 300 μ l de PBS-1% formaldehído antes de ser analizadas por citometría de flujo.

b. Procesamiento y análisis de datos

El equipo utilizado fue un FACScalibur usando el software CellQuestPro (Becton Dickinson). Para cada una de las muestras, las células viables se seleccionaron por criterios de tamaño y complejidad, analizándose 20.000 eventos en cada tinción, excepto para las tinciones del linaje T γ δ en las que se analizaron un total de 100.000 eventos. El análisis posterior de los datos, así como su representación gráfica fue realizado gracias al software Flowjo (Tree Star, Inc.).

Se consideraron positivas todas las células con intensidades de fluorescencia por encima del límite superior de los correspondientes controles negativos (anticuerpos inespecíficos del mismo isotipo y especie que el empleado en la tinción). Los resultados se expresan en histogramas de intensidad de fluorescencia monoparamétricos. En éstos,

las abscisas representan la intensidad de fluorescencia para el marcador indicado, en una escala logarítmica, y las ordenadas representan el número de células en unidades arbitrarias.

Para comparar el nivel de expresión del complejo TCR/CD3 dentro de las subpoblaciones de linfocitos T, se realizó en primer lugar la gráfica biparamétrica que enfrenta CD4 y CD8. Dentro de ésta, se diseñaron ventanas que dividieran las células según su fenotipo CD4/CD8 tal y como muestra la figura III.2. De esta forma se analizó la tinción TCR/CD3 dentro de estas poblaciones generadas.

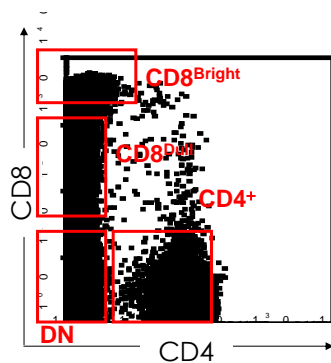


Fig. III.2. Diagrama de dos colores para tinción CD4 y CD8 de células humanas. En él se representa en rojo las ventanas poblacionales seleccionadas para su posterior análisis. Estas ventanas son similares en los análisis de ratón, con la excepción de la imposibilidad de diferenciar dos poblaciones CD8 positivas distintas.

III.3.2 Citometría intracelular

La citometría intracelular en humanos se realizó usando 0.5×10^6 células de líneas inmortalizadas con HVS. Para los ratones se usó el mismo número de células de timo, bazo y ganglios linfáticos. En el caso de los ratones, y por tratarse de células primarias, se realizó inicialmente una tinción extracelular con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 directamente marcados.

Para la tinción intracelular se lavaron las células dos veces en PBS. Posteriormente se resuspendieron en 500 μ l de PBS-4% formaldehído y se incubaron durante 20-30 minutos a 4°C. A continuación las células se permeabilizaron lavando los tubos dos veces con 100 μ l de PBS-0.1% saponina (Sigma). El siguiente paso fue el de

la incubación con el anticuerpo de interés diluido en PBS-0.1% saponina durante 20 minutos a 4°C. Tras la reacción de marcaje, las células se lavaron dos veces y se incubaron en PBS-0.1% saponina en presencia de estreptavidina o anticuerpo secundario conjugados, según la necesidad del marcaje, durante 30 minutos a 4°C y protegidas de la luz. Finalmente, las células se lavaron dos veces en PBS-BSA y se resuspendieron en 300µl de PBS antes de ser analizadas en el citómetro FACScalibur.

Los anticuerpos utilizados en el estudio se detallan en las tablas III.2 y III.3.

III.4 EVALUACIÓN FUNCIONAL

III.4.1 Activación celular

Para realizar los análisis funcionales en muchos de los casos hubo que activar las células previamente. Para la activación celular TCR-dependiente se utilizaron anticuerpos anti-CD3 que se pegaron previamente a la placa. Para ello se resuspendió el anticuerpo a la concentración deseada en PBS estéril, añadiéndose 50 µl por cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano, e incubó durante un período de 8-16 h a 37 °C, hasta su ulterior utilización. Los anticuerpos para activación fueron OKT3 y UCHT1 en el caso de humanos, y 2C11 y 17A2 para los ratones, todos a una concentración de 10µg/ml. Antes de añadir las células a los pocillos con anti-CD3 inmovilizado, se retiró el tampón sobrante y se realizaron 2 lavados con medio RPMI (añadiendo 200 µl/pocillo y retirándolos posteriormente). Las células, a razón de 0.5×10^6 por pocillo, se mantuvieron en contacto con el anticuerpo durante un periodo de 24 a 72 horas (en función del análisis a realizar) en el incubador a 37°C. Además, en el caso de las células humanas se utilizó como segundo estímulo el anticuerpo anti-CD28 (1µg/ml) que se añadió a la placa al mismo tiempo que las células.

En este trabajo también hemos utilizado otros estímulos. Uno de ellos fue la combinación de PMA (10 ng/ml, *Sigma*) más ionomicina (750 ng/ml, *Sigma*) incubados con las células (humanas y de ratón) durante 6-9 horas. Las células de ratón se activaron también con el mitógeno concanavalina A (ConA) a una concentración de 1 µg/ml. En este último caso se añadió a las 48 horas del estímulo rhIL-2 (100 U.I./ml) como co-estímulo. En cualquier caso, una vez habían sido activadas las células, se lavaron dos veces con PBS (centrifugación a 1600 rpm, 4 °C, 4 min) antes de su uso posterior.

III.4.2 Análisis morfológico de blastización

Tras la activación celular los linfocitos T cambian morfológicamente adquiriendo un aspecto denominado blástico, esto es, se hacen mayores tanto en tamaño como en complejidad. Para valorar este fenómeno analizamos como varía el MFI del parámetro FSC (tamaño) por citometría de flujo antes y después de la activación. Relativizamos los resultados obtenidos a través de lo que denominamos índice de blastización (IB) calculado:

$$IB = \left(\frac{MFI(FSC)_{\text{activ}} - MFI(FSC)_{\text{no activ}}}{MFI(FSC)_{\text{no activ}}} \right) \times 100$$

III.4.3 Inducción de moléculas de activación

En el caso de los humanos, se analizó la inducción del marcador de activación temprana CD69 a las 24 horas; para ello se realizó un marcaje extracelular con el anticuerpo anti-CD69 (Leu-23, 1 µg/ml) siguiendo protocolo estándar para ser

finalmente analizadas mediante citometría de flujo. Para los ratones, y gracias a su mayor disponibilidad, se pudo analizar distintos marcadores de activación, a saber, CD69, CD5, CD25 e ICOS. Todos ellos a las 24 horas del estímulo y siguiendo protocolo estándar de marcaje extracelular de células de bazo. Los datos obtenidos se tabularon para analizar el porcentaje de inducción (I) de cada marcador a través de la intensidad de fluorescencia obtenida. La fórmula usada fue:

$$\% \text{ Inducción} = \left(\frac{\text{MFI}_{\text{activ}} - \text{MFI}_{\text{no activ}}}{\text{MFI}_{\text{no activ}}} \right) \times 100$$

III.4.4 Análisis de proliferación

El estudio de la proliferación celular se determinó de forma indirecta a través de la síntesis de DNA por la incorporación de timidina marcada con tritio (TH3, Puzas y Goodman, 1978). Las células tanto humanas (PBL y líneas HTLV-1) y de ratón (primarias de bazo) fueron sembradas en placas de 96 pocillos a densidad de 0.5×10^6 células por pocillo, en contacto con anticuerpo inmovilizado anti-CD3 o con PMA+ Ionomicina. A las 72 horas se añadió 1,25 μCi de timidina tritiada en cada pocillo, manteniéndose 24 horas más a 37°C para determinar la síntesis de DNA.

Esta medición se realizó fijando los núcleos en papel de Betaplate previa lisis celular en Cell Harvester (1295-001 Wallac). Se determinó la cantidad de [^3H]-timidina incorporada al material precipitable de ácido tricloroacético en medidor de centelleo Betaplate 1205 (Wallac). Los resultados finales se expresaron en n° de cuentas por minuto (cpm) por pocillo.

En este trabajo se ha realizado también un análisis retrospectivo de estudios de proliferación celular ante una variedad de estímulos en la familia 1 (en paciente y familiares heterocigotos), durante 18 años (1987-2005). Para ello hemos revisado los datos almacenados en los informes correspondientes en el hospital de referencia

(Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid) y que nos han sido amablemente cedidos por el Dr. Luis M. Allende.

III.4.5 Modulación del TCR con ésteres de forbol

Estos estudios se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en Dietrich y col. (1994). Para dichos experimentos las células a analizar se lavaron dos veces en PBS, se resuspendieron en medio RPMI completo sin IL2 a una concentración final de 5×10^6 células/ml y se incubaron de 30 minutos a 4 horas a 37°C, en presencia o ausencia de PMA 20 ng/ml. Tras la estimulación, las células se lavaron en PBS-1% FCS y se tiñeron con un anticuerpo anti-CD3 (SK7 para los humanos y 2C11 para ratón) siguiendo el protocolo descrito el punto III.3.1.a. Los resultados se expresan en términos de porcentaje de expresión de CD3 remanente en la membrana de las correspondientes células tras la incubación con PMA, relativo al nivel de CD3 expresado antes de la estimulación.

III.4.6 Modulación del TCR con anticuerpos anti-CD3

La activación celular mediada por anticuerpos anti-CD3 se realizó en ensayos de dosis-respuesta y de cinética, de forma similar a lo descrito por Lauritsen y col. (1998). Para ello se partió de una suspensión celular de 5×10^5 células/ml resuspendidas en medio RPMI completo sin IL-2 y se dispensaron 200µl/pocillo a una placa de 96p con fondo plano (Iwaki). En el caso de los humanos, las células se incubaron en presencia o ausencia de 10 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (UCHT-1), inmovilizado durante 16h a 37°C. Tras la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con el correspondiente mAb anti-CD3 (SK7).

Para los ratones, las células se incubaron en presencia de anticuerpo 2C11 (10µg/ml) durante un periodo de 1, 2, 3, 4, 16 ó 24 horas. Tras la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con el correspondiente mAb anti-TCRβ (H57-597).

III.4.7 Producción de citocinas

Para la evaluación de citocinas se ha utilizado el kit *Intracellular Cytokine Staining Starter Kit* (BD Pharmigen, Cat.) según las especificaciones del fabricante. El protocolo requirió de la activación previa de las células de estudio, tal y como se indica en el apartado III.5.1. Posteriormente se procedió a la tinción intracelular que precisó de fijación y permeabilización previas (*BD Cytofix/Cytoperm™ Buffer*). En último término, se procedió a la tinción con los anticuerpos conjugados a ficoeritrina (PE).

III.4.8 Flujo de calcio intracelular

Para la determinación del calcio intracelular se utilizó el indicador Fluo-3/AM (Merritt et al., 1990). El aceto-metil éster de fluo-3 (Fluo-3/AM) es un derivado éster del fluo-3 no fluorescente y permeable a la membrana celular. Una vez dentro de la célula es hidrolizado por las esterasas celulares que lo convierten en un compuesto impermeable a la membrana plasmática y que da lugar a la fluorescencia al unirse a los iones de Ca^{2+} (emitiendo a 526 nm).

Brevemente, 0.5×10^6 células se lavaron e incubaron en medio HBSS junto con Fluo-3AM (10µM, 45 min, 37°C, en agitación). A continuación, las células se lavaron en HBSS+ Ca^{2+} y se resuspendieron en este mismo medio. Se comenzó a adquirir por el citómetro y tras 30 segundos se añadió 10µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (UCHT-1), para seguir a continuación su análisis citométrico durante dos minutos.

III.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando el programa estadístico SPSS versión 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Todos los valores p se consideraron estadísticamente significativos cuando fueron inferiores a 0,05. Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov se comprobó la normalidad de las variables. En el caso de aquellas que no seguían una distribución normal, se decidió emplear pruebas no paramétricas para los distintos análisis realizados. Las comparaciones entre grupos para las distintas variables se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney. Se usó la prueba de T-student como prueba de tipo paramétrico para aquellas variables que siguieran distribución normal. En estos casos los datos se representaron como media \pm SD (Desviación estándar) o \pm SEM (error estándar de la media).

III.6 ANTICUERPOS

III.6.1 Anticuerpos contra moléculas humanas

ESPECIFICIDAD	Anticuerpo	Isotipo/Origen	Uso ¹	Conjugado ²	Procedencia ³
hCD3 (CD3 $\epsilon\delta/\epsilon\gamma$)	SK7	IgG1/Ratón	TE	-PE	B/D
hCD3 (CD3 ϵ)	UCHT1	IgG1/Ratón	TE y S	n.c.	IT
hCD3 (CD3 $\epsilon\delta/\epsilon\gamma$)	F101.01	IgG1/Ratón	TE y S	n.c.	Dr. Rubin
hCD3 (CD3 $\epsilon\delta/\epsilon\gamma$)	OKT3	IgG2a/Ratón	TE	n.c.	Dr. Rubin
hCD3 (CD3 ϵ)	Cris 7	IgG2a/Ratón	TE	n.c.	Dr. Vilella
hCD3 (CD3 ϵ)	S4.1	IgG2a/Ratón	TE	-FITC	Invitrogen
hCD3 (CD3 ϵ)	RW2-8C8	IgG2/Ratón	TE	n.c.	Dr. Reinherz
hCD3 (CD3 ϵ)	MEM57	IgG2/Ratón	TE	n.c.	Dr. Alarcón
hCD3 (CD3 $\epsilon\delta/\epsilon\gamma$)	OKT3	IgG2a/Ratón	TE	n.c.	Dr. Rubin
hCD3 (CD3 $\epsilon\delta/\epsilon\gamma$)	Sp34	IgG3/Ratón	TI	n.c.	B/D
hCD3 (CD3 γ)	TG5	AS/Conejo	TI	n.c.	Dr. Alexander
hCD3 (CD3 γ)	HMT3.2	IgG _{2a} , Hamster armenian	TI	n.c.	
h _m CD3 (CD3 δ)	M20 δ	IgG/Conejo	WB	n.c.	Santa Cruz
h _m CD3 (CD3 ϵ)	M20 ϵ	IgG/Conejo	WB	n.c.	Santa Cruz
hCD3 (CD3 ζ)	448	AS/Ratón	WB	n.c.	Dr. Alarcón
hTCR β	BMA031	IgG2b	TE	n.c.	Dra. Toribio
hTCR β	β F1	IgG1/Ratón	TI	n.c.	Dr. Alarcón
hTCR $\gamma\delta$	Immu510	IgG1/Ratón		-FITC	B/D
hCD4	Leu3a	IgG2a/Ratón	TE	-PE, -TC	B/D
hCD8	CD8	IgG2a/Ratón	TE	-FITC, -PE	B/D
hCD1a	OKT6	IgG1/Ratón		n.c.	Dr. Martinez-Naves
hCD69	Leu-23	IgG1/Ratón	TE	n.c.	B/D
hCD28	CD28	IgG1/Ratón	TE Y S	n.c.	B/D

Tabla III.2. Anticuerpos contra moléculas humanas utilizados en este trabajo. Se indica nombre, especificidad, procedencia y uso de los distintos anticuerpos utilizados. ¹*Uso*: TE = Tinción Extracelular, TI= Tinción intracelular, S= Estimulación, WB= Western Blot. ²*Conjugado*: nc= no conjugado. ³*Procedencia*: B/D =Becton Dickinson, I= Immunotech

III.6.2 Anticuerpos contra moléculas de ratón

ESPECIFICIDAD	Anticuerpo	Isotipo/Origen	Uso ¹	Conjugado ²	Procedencia ³
mCD3 (CD3εδ/εγ)	145-2C11	IgG ₁ , Hamster armenian	TE, TI, S	biot	B/D
mCD3 (CD3εγ)	17A2	IgG _{2b} , rata	TE, TI	-PE	B/D
mCD3 (CD3εγ)	7D6	IgG2a/Ratón	TE, TI	nc	CBMSO
mTCRβ	H57-597	IgG _{2a} , Hamster armenian	TE, TI	biot	B/D
mTCRγδ	GL-3	IgG _{2a} , Hamster armenian	TE	-PE	B/D
mCD4	RM4-5	IgG _{2a} , rata	TE, TI	-PE, -FITC	B/D
mCD8α	53-6.7	IgG _{2a} , rata	TE	-PE, -FITC	B/D
mCD5	53-7.3	IgG _{2a} , rata	TE	-PE	B/D
mCD25	3C7	IgG _{2b} , rata	TE	-PE	B/D
mICOS	7E.17G9	IgG _{2b} , rata	TE	-PE	B/D
mCD69	H1.2F3	IgG ₁ , Hamster armenian	TE	-PE	B/D

Tabla III.3. Anticuerpos contra moléculas de ratón utilizados en este trabajo. Se indica nombre, especificidad, procedencia y uso de los distintos anticuerpos utilizados. ¹**Uso:** TE = Tinción Extracelular, TI= Tinción intracelular, S= Estimulación, WB= WEstern Blot. ²**Conjugado:** nc= no conjugado. ³**Procedencia:** B/D=Becton Dickinson, I= Immunotech

IV. Resultados

IV.1 EFECTOS DE LA HAPLOINSUFICIENCIA DE CD3 EN LA EXPRESIÓN DEL TCR

En el contexto de esta Tesis, el término “haploinsuficiencia” hace referencia a la condición de los individuos portadores, en heterocigosis, de un alelo mutado del gen *CD3G* o *CD3D*, independientemente de su impacto en la función celular. Por otro lado, se empleará el término “TCR” para referirse al complejo formado por las cadenas TCR, $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, más las cadenas CD3.

IV.1.1 Expresión intracelular del TCR en la haploinsuficiencia de CD3.

Para valorar el efecto de la haploinsuficiencia de CD3 γ en la expresión del TCR $\alpha\beta$, se procedió en primer lugar a determinar la cantidad de TCR intracelular por citometría de flujo. En el caso de los humanos, esta aproximación se realizó analizando líneas de células T transformadas con herpesvirus saimiri (HVS) derivadas de individuos $\gamma^{+/+}$, $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$. Para asegurarnos de la especificidad de la tinción con los anticuerpos anti-CD3, se realizaron tinciones empleando células B transformadas con el virus Epstein-Barr (EBV) (Küppers, 2003). Tal y como se muestra en la Figura IV.1, las células haploinsuficientes ($\gamma^{+/-}$) presentan una reducción consistente de la tinción con anticuerpo anti-CD3 ϵ (SP34), o con anticuerpos específicos de CD3 γ (TG5, HMT3.2) en comparación con las células suficientes ($\gamma^{+/+}$), pero menos marcada que en las células deficientes ($\gamma^{-/-}$). Esta reducción fue similar a la observada en la tinción con un anticuerpo contra la cadena TCR β (β F1) (datos no mostrados), lo que en su conjunto indica que la haploinsuficiencia de CD3 γ reduce la expresión intracelular de componentes del TCR $\alpha\beta$. La expresión de una molécula no asociada al TCR, como CD4, no se vio afectada en ninguno de los casos.

En el caso de los ratones, también se realizaron tinciones intracelulares con anticuerpos específicos para las cadenas CD3 del TCR. Así, al usar un anticuerpo anti-

CD3 ϵ (Fig. IV.2A) o anti-CD3 $\gamma\epsilon$ (Fig. IV.2B), se observa que las células $\gamma^{+/-}$ muestran un patrón de tinción intermedio entre el de las $\gamma^{+/+}$ y $\gamma^{-/-}$ en todos los órganos analizados, similar a lo observado en las células humanas haploinsuficientes para CD3 γ . Por tanto, la haploinsuficiencia de CD3 γ se asocia con una reducción en la expresión intracelular de los componentes del TCR, tanto en los linfocitos T $\alpha\beta$ humanos como en los de ratón.

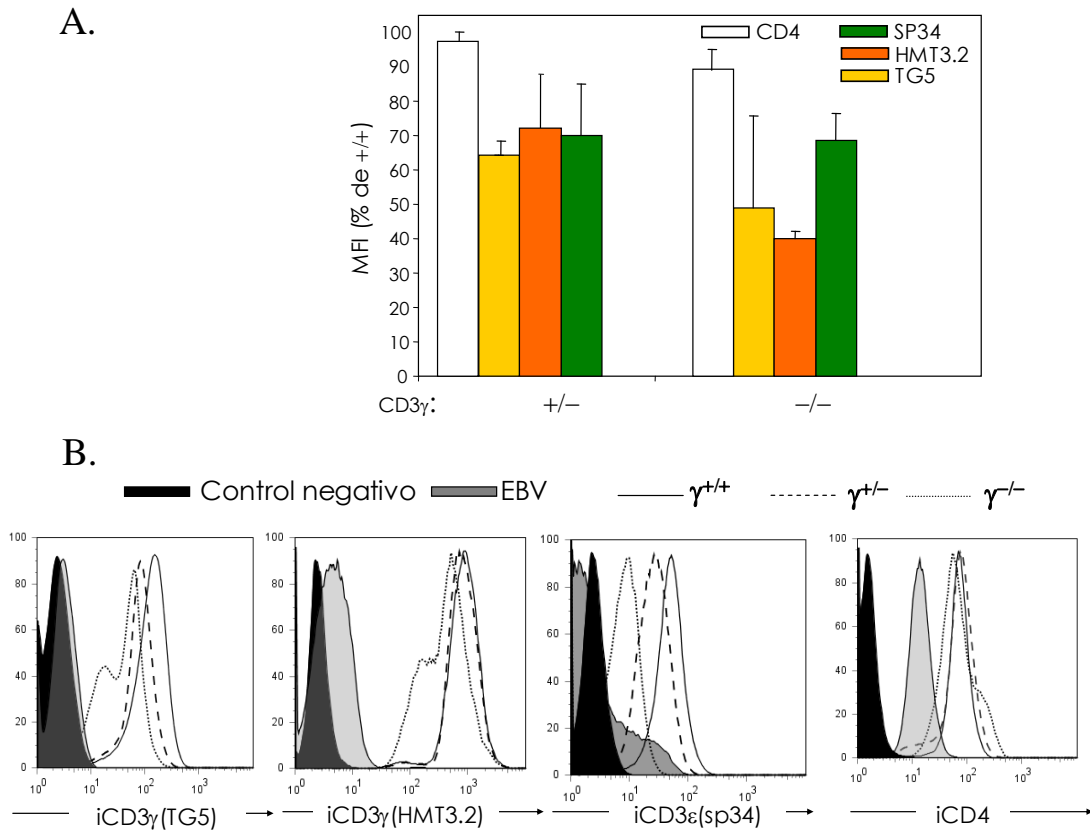


Fig. IV.1. Expresión intracelular del TCR $\alpha\beta$ en la haploinsuficiencia de CD3 γ en humanos. A. Expresión de CD3 en células HVS $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$ (MFI relativo a controles $\gamma^{+/+}$); $n=3$. **B.** Histogramas representativos de los resultados mostrados en A.

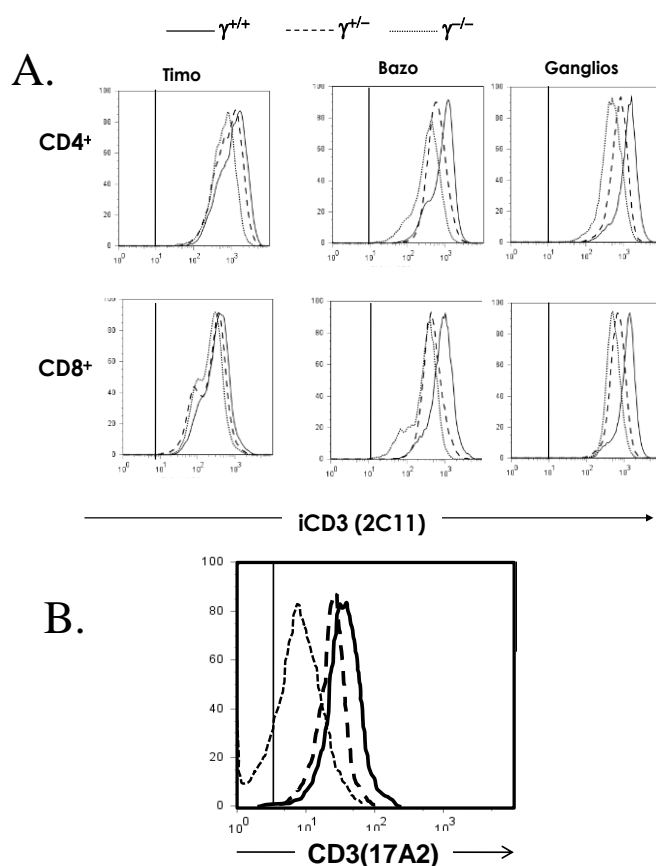


Fig. IV.2. Expresión intracelular del TCR $\alpha\beta$ en la haploinsuficiencia de CD3 γ en ratones. Histogramas representativos de tinción intracelular con los anticuerpos anti-CD3 A. 2C11 y B. 17A2 (en células CD4⁺) en ratones $\gamma^{+/+}$, $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$; n=3.

IV.1.2. Expresión del TCR de superficie en la haploinsuficiencia de CD3

Se sabe que los criterios TCR-dependientes para identificar células T por citometría de flujo producen una subestimación de éstas en los casos de deficiencias de CD3. Por esta razón, y para evitar infravaloraciones, se procuró utilizar criterios poblacionales TCR-independientes. Para probar los criterios seleccionados, que fueron la presencia de los correceptores de superficie CD4 y CD8, se utilizaron PBL humanas y células esplénicas de ratones (Fig. IV.3). De esta forma, y a través de triples marcajes en los que se incluía además anticuerpos contra el TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$, se concluyó que en

los humanos los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^{\text{bright}}$ son en más de un 98% linfocitos $T\alpha\beta$, tal y como era de esperar. En el caso de los linfocitos $T\gamma\delta$, se optó por el criterio de doble-negatividad (DN; $CD4^-CD8^-$), ya que en esta población alrededor de un 80% ($78 \pm 6\%$) de las células son linfocitos $T\gamma\delta$.

En el caso de los ratones, los resultados para los linfocitos $T\alpha\beta$ fueron similares a los humanos, pero sin separar las sub-poblaciones $CD8^{\text{bright}}$ y $CD8^{\text{dull}}$, por no existir esta diferencia en ratones. Los linfocitos DN de los ratones resultaron ser $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$ prácticamente a partes iguales, por esta razón se decidió no analizar los linfocitos $T\gamma\delta$ de forma TCR-independiente sino usando directamente anticuerpos anti-TCR δ , aún sabiendo los inconvenientes que ello conlleva.

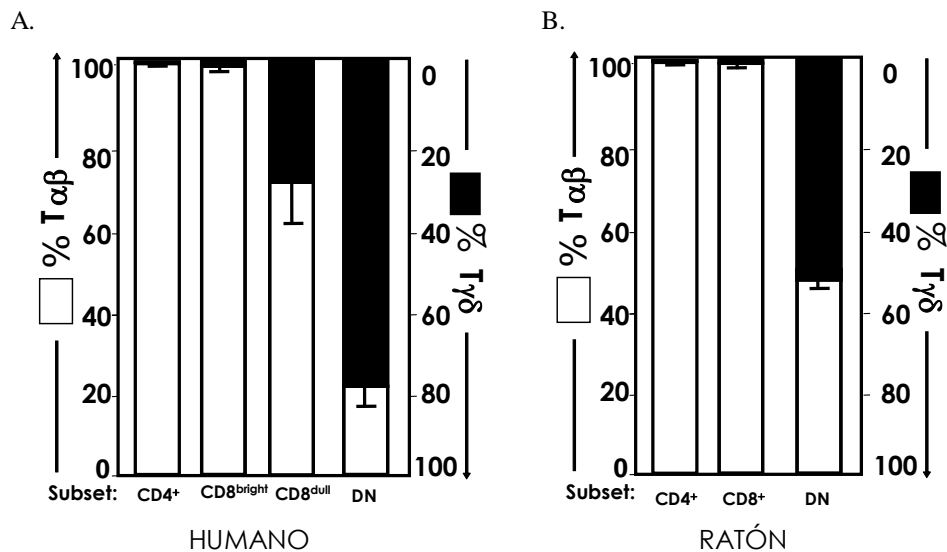


Fig. IV.3. Abundancia relativa de linfocitos $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$ en humanos y ratones.
A. PBL humanas. **B.** Células esplénicas de ratones C57BL/6; $n=3$ para cada especie.

Para poder discriminar lo mejor posible las diferencias de tinción entre las células humanas suficientes y haploinsuficientes, se realizaron ensayos para determinar la concentración de uso adecuada de los anticuerpos anti-CD3 y anti-TCR (Fig. IV.4). Para ello, se realizaron diluciones seriadas de los anticuerpos para determinar aquella

donde la diferencia en MFI entre los genotipos $\gamma^{+/+}$ y $\gamma^{+/-}$ fuese máxima (paneles superiores), pero con un porcentaje similar de células positivas (paneles inferiores).

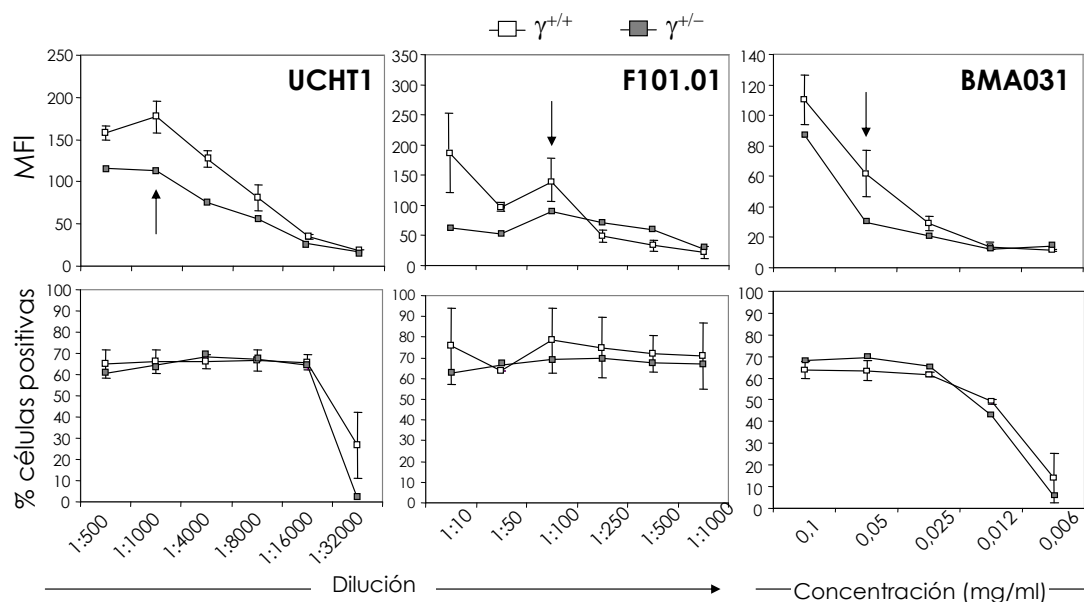


Fig. IV.4. Determinación de la dilución de uso adecuada de los anticuerpos dirigidos contra el TCR $\alpha\beta$ para el análisis de la haploinsuficiencia de CD3 γ en humanos. MFI (paneles superiores) y porcentaje de células positivas (paneles inferiores) de las tinciones con anticuerpos anti-CD3 ϵ (UCHT-1 y F101.01) y anti-TCR β (BMA031); $n=2$. Las flechas indican la dilución de uso seleccionada en cada caso.

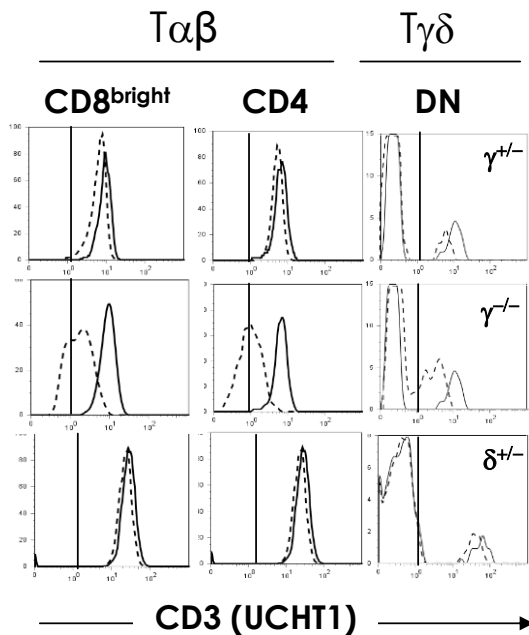
En el caso de las tinciones con células de ratón, estos ensayos no fueron necesarios puesto que las diluciones de uso estándar (recomendadas por el proveedor) de cada anticuerpo fueron suficientes para ver las diferencias entre los distintos genotipos CD3 analizados.

Una vez decidido el modo de determinación poblacional y la dilución del anticuerpo a usar, se procedió a analizar la expresión del TCR en la superficie celular. En el caso de los humanos haploinsuficientes para CD3, se analizaron PBL procedentes de ocho individuos portadores de mutaciones en *CD3G* en heterocigosis, y cuatro portadores de mutaciones en *CD3D*. Los resultados obtenidos (Fig. IV.5) indican que los individuos haploinsuficientes para *CD3G* poseen un fenotipo que hasta ahora había

pasado desapercibido, consistente en un decremento estadísticamente significativo en la expresión en superficie tanto del TCR $\alpha\beta$ (donde se alcanza sólo el 85% de la expresión normal) como del TCR $\gamma\delta$ (alrededor del 60% de la expresión normal). Estos resultados fueron consistentes para los linfocitos CD4 y CD8 dentro del linaje T $\alpha\beta$, así como para las células T $\gamma\delta$ (Fig. IV.5B).

En el caso de la haploinsuficiencia de CD3 δ , se encontró también una reducción estadísticamente significativa en la expresión en superficie del TCR, con respecto a los individuos suficientes. Sin embargo, este defecto es menor que el observado para los individuos $\gamma^{+/-}$, ya que el decremento se sitúa en torno al 10% (Fig. IV.5B).

A.



B.

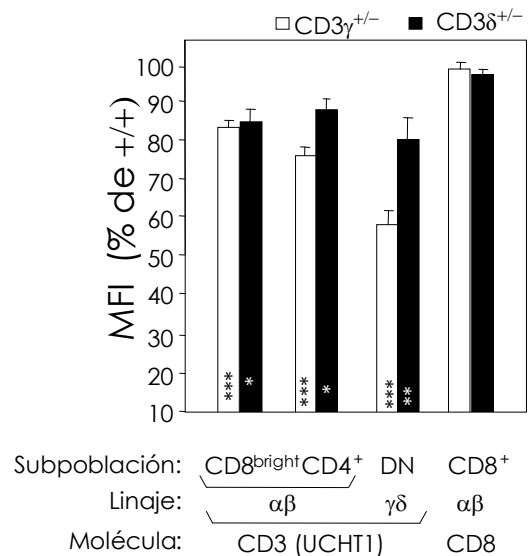


Fig. IV.5. Expresión en superficie del TCR en linfocitos T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$ en la haploinsuficiencia de CD3 γ y CD3 δ en humanos. A. Histogramas representativos de las tinción con anticuerpo anti-CD3 en PBL haploinsuficientes ($\gamma^{+/-}$, $\delta^{+/-}$) y deficientes ($\gamma^{-/-}$) (línea discontinua) en comparación con células suficientes (+/+) (línea continua). B. Expresión de CD3 y CD8 (MFI relativa a controles +/+) en las células T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$ haploinsuficientes. $\gamma^{+/-}$ (n=8), $\delta^{+/-}$ (n=4), controles +/+ (n=12). Resultados similares se obtuvieron para otros anticuerpos anti-CD3 (SK7, S4.1, o F101.01). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con los controles +/+, * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

Además de las células primarias de sangre periférica, en el laboratorio contábamos con líneas celulares inmortalizadas de individuos con los tres genotipos posibles para CD3 γ . La inmortalización se realizó por infección con dos virus distintos: HVS y virus linfotrópico humano tipo 1 (*HTLV-1*). Se ha descrito que las transformaciones con estos virus no varía el fenotipo de superficie, si bien la transformación en el caso de HTLV-1 presenta modificaciones en el segundo estadio de la infección que dificulta su uso por la pérdida de las cadenas CD3 (Rodríguez-Gallego et al, 1996; Yssel et al 1989). Por todo ello, utilizamos dichas líneas para confirmar la reproducibilidad del fenotipo observado en células primarias, controlando el estadio morfológico y la viabilidad de las líneas inmortalizadas. Como se puede ver en la Figura IV.6A, las diferencias en la expresión del TCR $\alpha\beta$ (medida con el anticuerpo anti-CD3 ϵ UCHT1) entre las células $\gamma^{+/+}$, $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$, se mantienen después de la transformación con HVS ó HTLV-1. De hecho, la disminución de la expresión en las células $\gamma^{+/-}$ en relación a las células $\gamma^{+/+}$ es mayor que la observada en células primarias, ya que se encuentra en un rango del 50-70% de la expresión normal. En las líneas HVS se realizó adicionalmente un barrido epitópico (Fig. IV.6.B) con una batería de anticuerpos anti-CD3, obteniéndose los siguientes resultados:

- Todos los anticuerpos probados, con la excepción de RW28C8, detectan diferencias significativas en la tinción del TCR $\alpha\beta$ de superficie entre las células suficientes y las haploinsuficientes, si bien RW28C8 muestra un comportamiento similar al del resto de anticuerpos.

- El defecto de expresión del TCR $\alpha\beta$ en las células haploinsuficientes para CD3 γ varía en función del epítipo reconocido por el anticuerpo anti-CD3, de tal forma que si bien la mayoría detecta un defecto de expresión de alrededor del 40%, la tinción con el anticuerpo OKT3 revela un defecto de mayor magnitud, consistente en una reducción del orden del 70% en la expresión en superficie del TCR $\alpha\beta$ en las células $\gamma^{+/-}$ respecto a las células $\gamma^{+/+}$.

- En las células deficientes de CD3 γ , todos los anticuerpos anti-CD3, exceptuando Cris7, detectan un defecto de magnitud comparable en la expresión del TCR $\alpha\beta$.

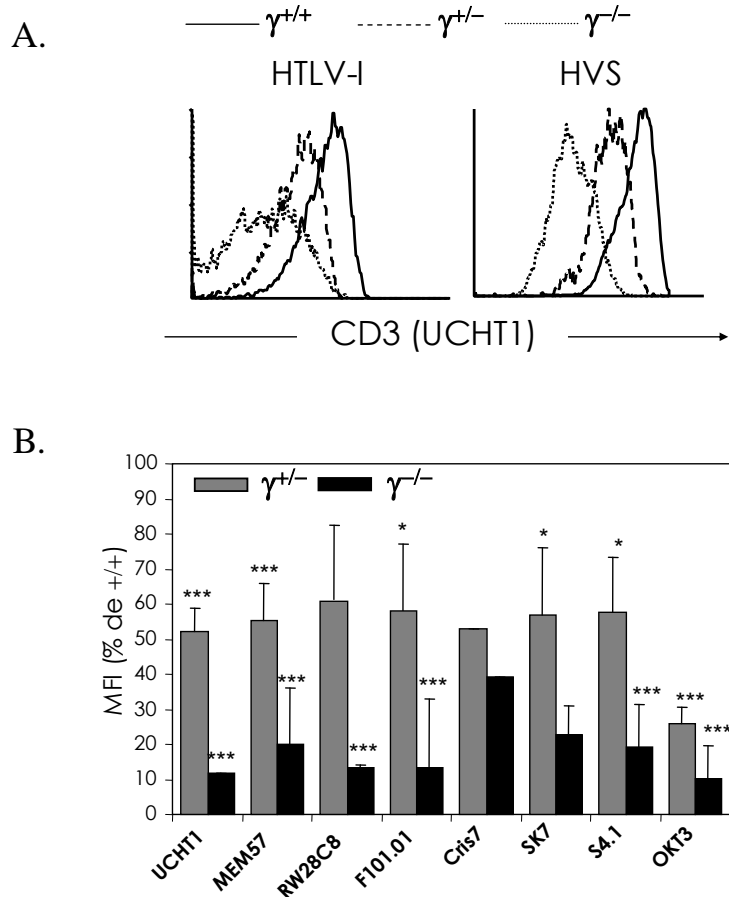


Fig. IV.6. Expresión del TCR en superficie en células T $\alpha\beta$ transformadas y haploinsuficientes o deficientes de CD3 γ . A. Histogramas representativos de la tinción en superficie con anticuerpo anti-CD3 (UCHT-1) en células transformadas con HTLV-1 (izquierda) o HVS (derecha). B. Expresión de CD3 (MFI relativa a controles $\gamma^{+/+}$) en las células HVS $\gamma^{+/-}$ y HVS $\gamma^{-/-}$, medida con los anticuerpos anti-CD3 señalados, $n=3$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Volviendo al estudio de las células primarias humanas con distinto genotipo CD3, al analizar la unión en superficie de los anticuerpos anti-CD3, como medida de la expresión del TCR, se observó que las células T $\gamma\delta$ de individuos $\gamma^{+/-}$ tenían un defecto significativamente mayor ($55\pm 3\%$ de la expresión normal) al observado en el linaje T $\alpha\beta$ ($82\pm 8\%$ de la expresión normal) (Fig. IV.7.A). Esta reducción discordante fue

específica de los individuos $\gamma^{+/-}$, no estando presente en individuos $\delta^{+/-}$ o $\gamma^{-/-}$, donde el efecto fue el contrario, y fue confirmada al calcular la proporción de la expresión del TCR $\gamma\delta$ *versus* la del TCR $\alpha\beta$, medida con el anticuerpo anti-CD3 UCHT-1 (Fig. IV.7B). Tal proporción es normalmente de 1.9 ± 0.22 (Thibault y Bardos, 1995; Nicolas et al., 2001), y en ese rango se encuentra en todos los genotipos a excepción del $\gamma^{+/-}$, donde se reduce a 1.2 ± 0.14 . En conjunto, estos resultados indican que la expresión en superficie del TCR $\gamma\delta$ es más dependiente de la abundancia de CD3 γ que la expresión del TCR $\alpha\beta$ en las células $\gamma^{+/-}$, pero no en las $\delta^{+/-}$ o $\gamma^{-/-}$.

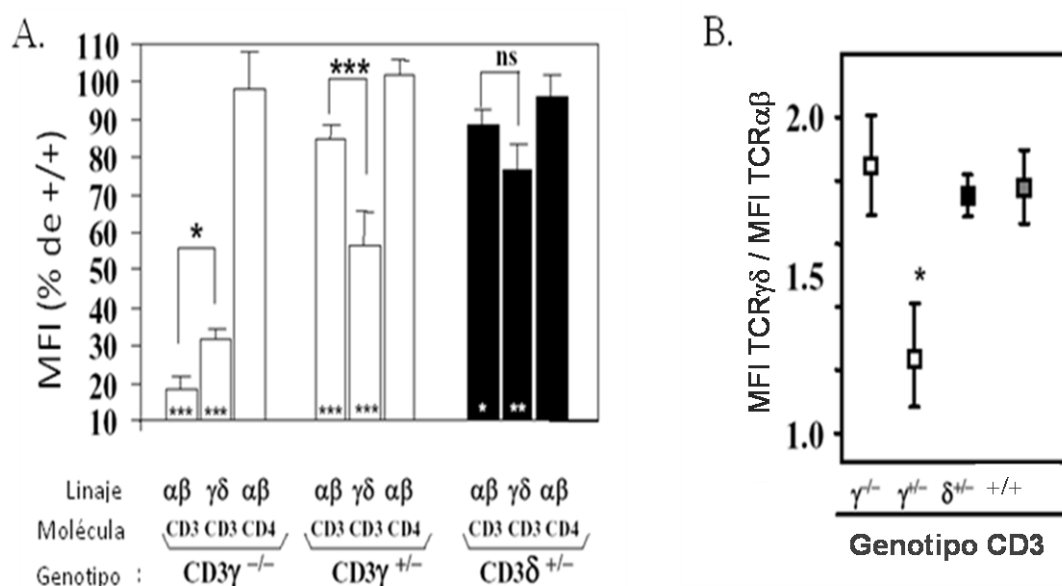


Figura IV.7. Reducción discordante de la expresión en superficie del TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ en la haploinsuficiencia de CD3 γ , pero no de CD3 δ , en humanos. A. Expresión de CD3 (MFI relativa a controles +/+, $n=7$) en células T $\alpha\beta$ CD8^{bright} $\gamma^{-/-}$ ($n=3$), $\gamma^{+/-}$ ($n=8$) y $\delta^{+/-}$ ($n=4$). Se obtuvieron resultados equiparables al analizar células T CD4⁺, y con otros anticuerpos anti-CD3 (SK7, S4.1, F101.01). Los asteriscos en las barras indican diferencias significativas con respecto a controles +/+; otras comparaciones se indican con líneas. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. **B.** Expresión del TCR $\gamma\delta$ versus TCR $\alpha\beta$ (MFI TCR $\gamma\delta$ /MFI TCR $\alpha\beta$). * $p<0,05$ en comparación con el resto de genotipos.

En el caso de los ratones con distintos genotipos para CD3, el análisis de la expresión en superficie del TCR fue posible en distintos órganos (Fig. IV.8). Las células T $\alpha\beta$ maduras del timo y las del bazo de los ratones $\gamma^{-/-}$ presentaron una reducción significativa (50-70% de la expresión de los $\gamma^{+/+}$), que es incluso mayor a la observada en los humanos (Fig. IV.8, A y C). Sin embargo, estas diferencias son menores e incluso para algunos ratones imperceptibles, cuando las células T $\alpha\beta$ provienen de sangre ó de ganglios linfáticos (87-96% de la expresión en los $\gamma^{+/+}$). En todos los casos, no obstante, las tinciones son similares en las células CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$. Por otro lado, y al igual que ocurre en las células T humanas, la haploinsuficiencia de CD3 δ tiene un impacto menor en la expresión en superficie del TCR $\alpha\beta$ (Fig. IV.8, B y C).

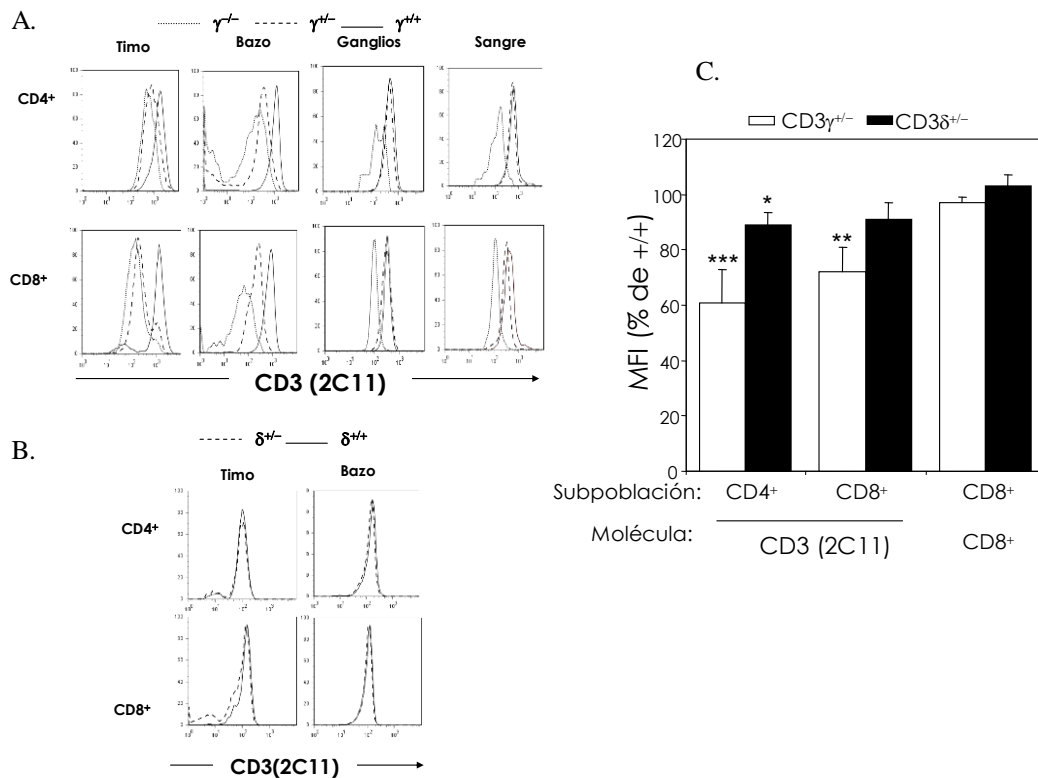


Fig. IV.8. Expresión en superficie del TCR en linfocitos T $\alpha\beta$ en la haploinsuficiencia de CD3 γ y CD3 δ en ratones. A y B. Histogramas representativos de la tinción en superficie con anticuerpo anti-CD3 (2C11). C. Expresión de CD3 (MFI relativa a controles +/+) en células de bazo $\gamma^{-/-}$ (n=18) y $\delta^{-/-}$ (n=5). *p<0,05; **p<0,01; *p<0,001.**

A continuación, se procedió a analizar si en el modelo mudo también se producía una discordancia en el efecto de la haploinsuficiencia de CD3 entre los linajes $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$. Como ya se mostró anteriormente, en los ratones no es posible identificar adecuadamente las células $T\gamma\delta$ usando criterios TCR-independientes. Por esta razón, se decidió analizar la expresión de CD3 dentro de las células $TCR\gamma\delta^+$ y $TCR\alpha\beta^+$ (Fig. IV.9A). En el caso de los ratones no se detectaron diferencias significativas en cuanto al descenso de expresión del TCR en superficie entre los linfocitos $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$ (Fig. IV.9B). Sí se observa, sin embargo, una tendencia hacia un defecto ligeramente mayor en el linaje $T\gamma\delta$ que en el $T\alpha\beta$ en las células haploinsuficientes.

Esta tendencia es la misma que la observada en el caso de los ratones $\gamma^{-/-}$, excepto para las células de sangre, donde las células $\gamma^{-/-}$ presentan un defecto mayor en la expresión del $TCR\alpha\beta$ que en el $TCR\gamma\delta$ (Fig. IV.9B). Curiosamente, este último hecho coincide con lo observado en las células humanas deficientes de $CD3\gamma$ (derivadas de sangre), en las cuales la expresión del TCR en la superficie está más afectada en las células $T\alpha\beta$ que en las $T\gamma\delta$.

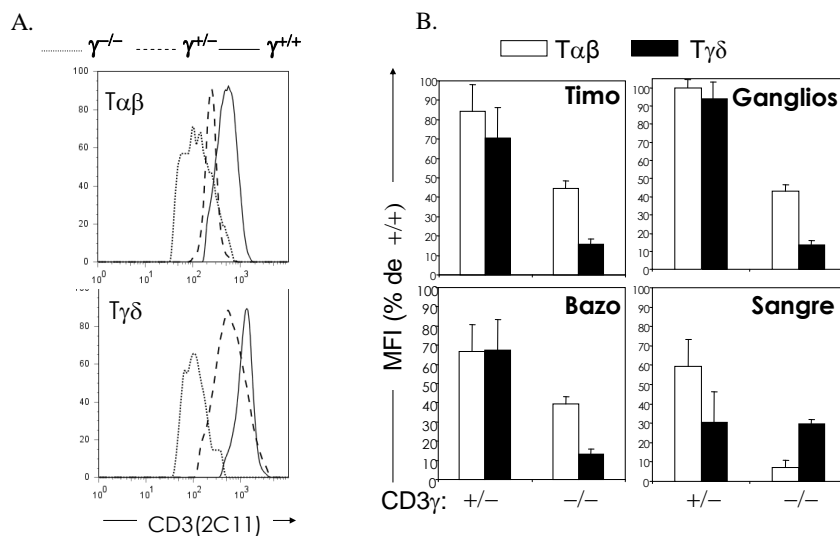


Fig. IV.9. Expresión en superficie del TCR en linfocitos $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$ en la haploinsuficiencia y deficiencia de $CD3\gamma$ en ratones. A Histogramas representativos de tinciones con anticuerpo anti-CD3 dentro de los linajes $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$ para los tres genotipos de $CD3\gamma$. B. Expresión de CD3 (MFI relativa a controles $\gamma^{+/+}$).

IV.2 EFECTOS DE LA HAPLOINSUFICIENCIA DE CD3 EN LA FUNCIÓN DEL TCR

IV.2.1 Efectos en el desarrollo de los linfocitos T.

En primer término, para valorar el número absoluto de linfocitos en los individuos analizados se utilizaron estrategias diferentes en función de que se tratase de humanos o ratones, ya que la tecnología disponible era distinta.

En el caso de las muestras de humano, el número absoluto de linfocitos se calculó a través de la técnica de *coulter* por citometría de flujo en los hospitales de referencia de las familias (tabla III.1). En la Figura IV.10 se muestran los números absolutos de células para los distintos genotipos analizados. Se puede observar como en el caso de los individuos $\gamma^{+/-}$, el número absoluto de linfocitos T tanto totales como subpoblaciones, está reducido de forma significativa en comparación a los de los controles normales analizados; pese a ésta reducción, estos números se encuentran dentro del intervalo de normalidad establecido por los percentiles P5 y P95 de la población sana (Comans-Bitter et al., 1997). Los resultados para los individuos $\delta^{+/-}$ son muy similares a los de los haploinsuficientes para CD3 γ .

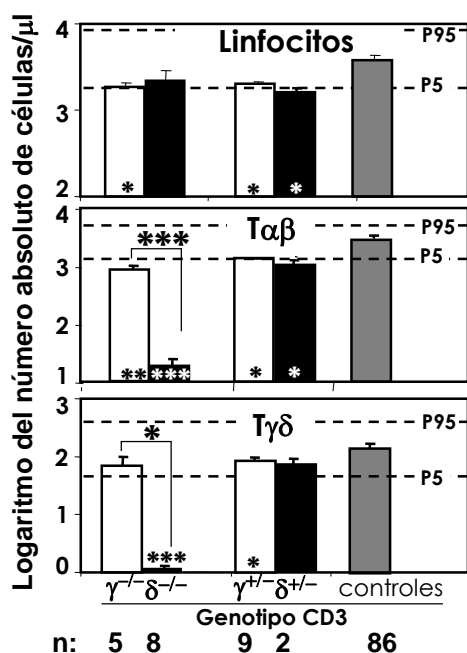


Fig. IV.10. Abundancia de linfocitos T en la haploinsuficiencia y deficiencia de CD3 γ y CD3 δ en humanos. Número absoluto de células por μ L en individuos suficientes (controles), haploinsuficientes o deficientes de CD3 γ o CD3 δ . Además del número absoluto de linfocitos totales, se muestran las poblaciones T $\alpha\beta$ (medida como CD4 $^{+}$ +CD8 bright) y T $\gamma\delta$ (medida como Immu512 $^{+}$). Las líneas horizontales representan los valores de los percentiles P5 y P95 de la población normal. Los datos para los deficientes de CD3 γ y CD3 δ se obtuvieron de la literatura (Dadi et al., 2003; De Saint Basile et al., 2004; Takada et al., 2005; Regueiro et al., 1986; van Tol et al., 1997; Recio et al., 2007). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

En el caso de los ratones, la valoración del número de linfocitos se hizo a través del recuento de células recuperadas tras la homogenización de los órganos. El número de linfocitos T $\alpha\beta$ se calculó sumando los números de células CD4⁺ y CD8⁺, en base a los porcentajes de estas células obtenidos posteriormente por citometría de flujo. En la figura IV.11A se muestran los resultados en los distintos órganos (timo, bazo y ganglios linfáticos) de ratones deficientes y haploinsuficientes para CD3 γ , con respecto a los controles normales. Se puede observar que mientras los ratones $\gamma^{-/-}$ muestran una reducción muy significativa con respecto a los controles, los ratones $\gamma^{+/-}$ presentan valores próximos a los de los controles $\gamma^{+/+}$, sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos genotipos. En el caso de la haploinsuficiencia de CD3 δ , los números absolutos de células totales y los de linfocitos T en el bazo son también comparables a los de los ratones controles, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos genotipos, tal y como se muestra en la Figura IV.11B. En contraste, estos parámetros están severamente reducidos en los ratones deficientes de CD3 δ .

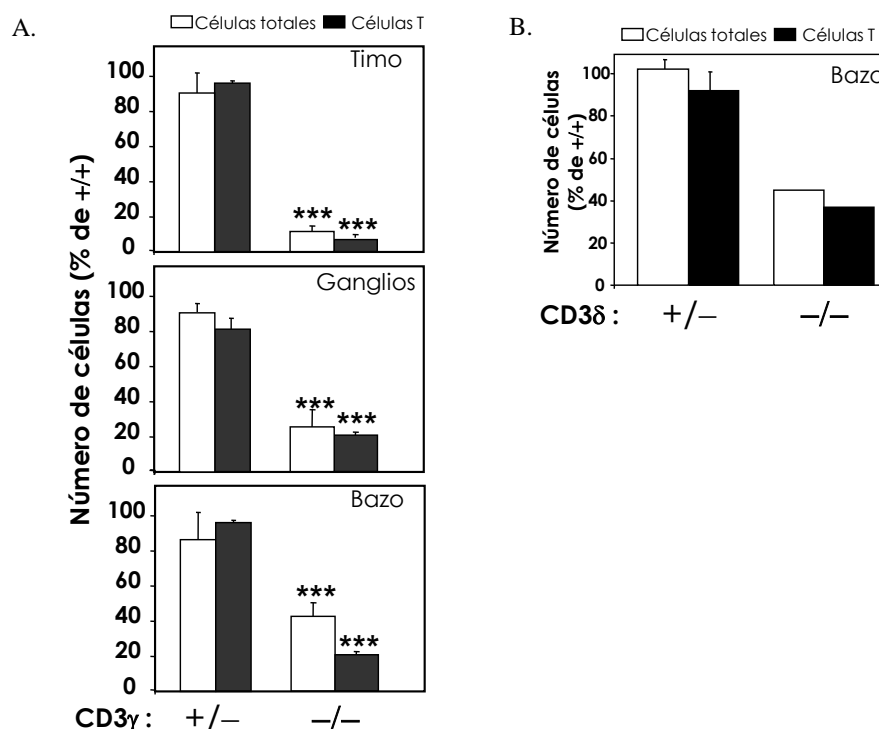
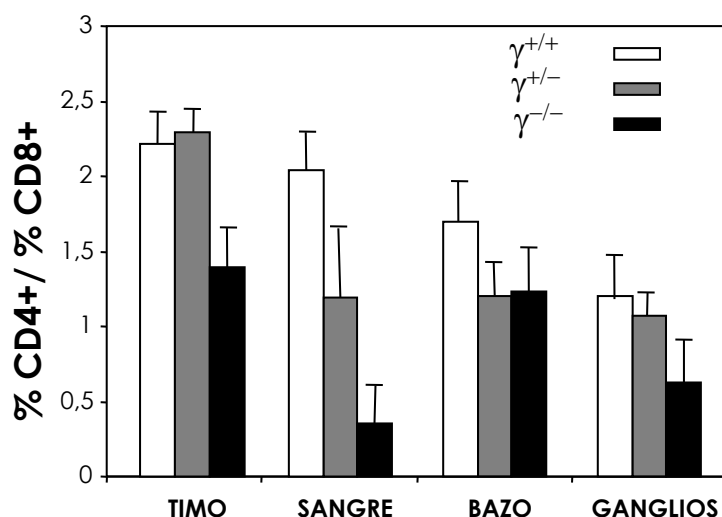


Fig. IV.11. Abundancia de linfocitos T en la haploinsuficiencia y deficiencia de CD3 γ y CD3 δ en ratones. Número relativo de células en los órganos indicados de ratones **A.** $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$ ($n=7$ y $n=5$, respectivamente) y **B.** $\delta^{+/-}$ y $\delta^{-/-}$ (bazo; $n=5$ y $n=1$, respectivamente) con respecto a controles +/+. *** $p<0,001$.

A continuación, se procedió a valorar la composición porcentual del repertorio de linfocitos $T\alpha\beta$ en relación a los linajes $CD4^+$ y $CD8^+$. En una situación normal, los linfocitos T $CD4^+$ son dos veces más abundantes que los linfocitos T $CD8^+$ (Thibault et al., 1995). En contraste, en la haploinsuficiencia $CD3\gamma$ se produce un cambio en este patrón. En el caso de los ratones, se produce un descenso en la proporción de $CD4^+/CD8^+$, tal y como se muestra en la Figura IV.12A, en todos los órganos analizados excepto en el timo (aunque el análisis posterior de una cohorte mayor de ratones reveló un descenso similar también en el timo). Esta alteración es aún más marcada en los ratones deficientes de $CD3\gamma$, pero de mucha menor magnitud en los ratones $\delta^{+/-}$ (Muñoz-Ruiz et al., datos no publicados), en comparación con los haploinsuficientes para $CD3\gamma$. En contraste, en PBL humanas el resultado es el contrario, es decir, tanto la haploinsuficiencia como la deficiencia de $CD3\gamma$ provoca un aumento de la relación $CD4^+/CD8^+$, siendo el efecto de mayor magnitud en las células deficientes (Fig. IV.12B). Por su parte, los individuos haploinsuficientes para $CD3\delta$ presentan una proporción $CD4^+/CD8^+$ en el rango normal (Muñoz-Ruiz et al., 2013).

A.



B.

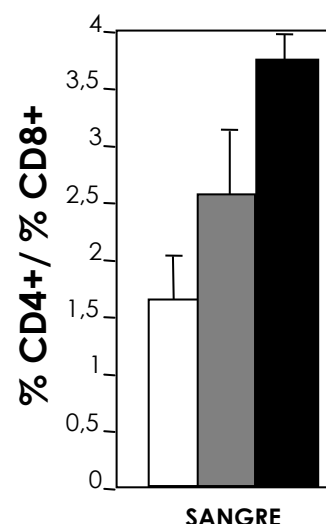


Fig. IV.12. Proporción $CD4^+/CD8^+$ en la haploinsuficiencia y deficiencia de $CD3\gamma$. A. Células de ratón de los órganos indicados. B. PBL humanas. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti- $CD4$ y anti- $CD8$ y analizadas por citometría de flujo.

El cambio en la proporción $CD4^+/CD8^+$ en las células $T\alpha\beta\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$ se debe, en el caso de los ratones, a un aumento de la frecuencia de linfocitos T $CD8^+$ (Fig. IV.13A), que es menos evidente en los timocitos haploinsuficientes (aunque el análisis posterior de un mayor número de animales confirmó que también en el timo se produce este aumento porcentual de las células T $CD8^+$). En el caso de los humanos, es una disminución en la frecuencia de células T $CD8^+$ lo que hace que aumente la proporción $CD4^+/CD8^+$ (Fig. IV.13B).

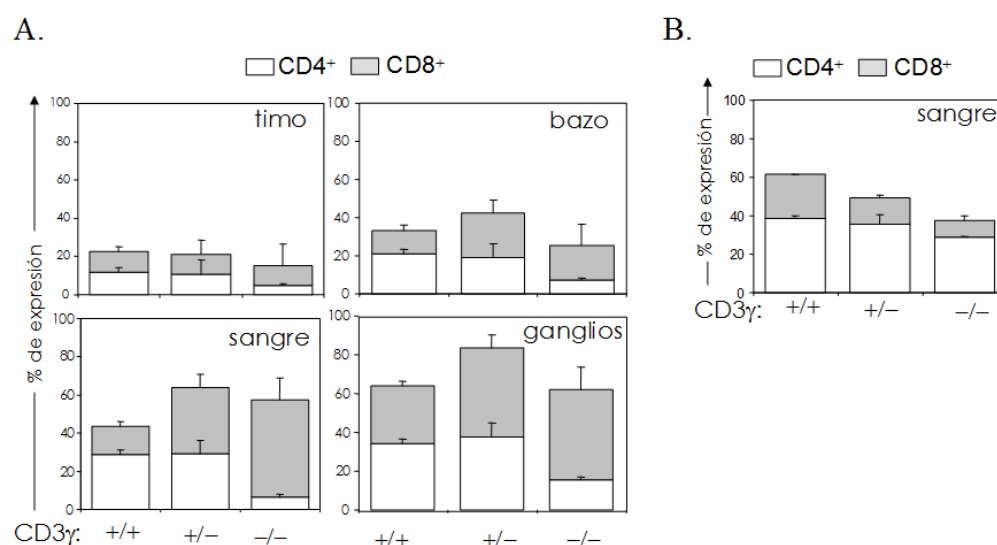


Fig. IV.13. Frecuencia de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ en la haploinsuficiencia y deficiencia de $CD3\gamma$. A. Linfocitos $T\alpha\beta$ de ratón en los órganos indicados. B. Linfocitos $T\alpha\beta$ humanos (PBL).

IV.2.2 Efectos en la activación de los linfocitos T.

IV.2.2.1 Aumento del tamaño celular.

El primer efecto conspicuo de la activación vía TCR de los linfocitos T es un aumento en el tamaño celular, un evento conocido como “blastización”. Este cambio de tamaño puede ser cuantificado a través del parámetro citométrico FSC (Fig. IV.14A), lo que permite establecer un índice de blastización (ver Material y métodos). De esta

forma, usando anti-CD3 y ConA como estímulos que operan a través de la agregación del TCR de superficie, se evaluó la capacidad de blastización de las células de bazo de ratones con distintos genotipos para CD3 γ y CD3 δ (Fig. IV.14B). Las células haploinsuficientes para CD3 γ y CD3 δ exhibieron una respuesta comparable a la de las células suficientes, y solo las células $\gamma^{-/-}$ mostraron un defecto significativo en la blastización inducida por activación (Fig. IV.14C).

IV.2.2.2 Inducción de marcadores de activación.

En fases tempranas de la activación vía TCR de los linfocitos T se produce un aumento en la expresión en la superficie celular de moléculas como CD69, CD25, CD5 e ICOS, las cuales se consideran por tanto marcadores de activación temprana.

En el caso de los humanos, las células $\gamma^{+/-}$ son capaces de inducir CD69 en su superficie tras la estimulación vía TCR con un anticuerpo anti-CD3 (más anti-CD28) (Fig. IV.15A). Sin embargo, si se cuantifica esta inducción tanto en porcentaje de positividad para el marcador como en MFI, podemos ver que es claramente menor a la observada en células $\gamma^{+/+}$ (Fig. IV.15B). Estas diferencias no se observan al estimular con PMA, un estímulo independiente de la expresión en superficie del TCR, ya que en este caso tanto el porcentaje de células CD69 $^{+}$ como su MFI es similar en linfocitos T $\gamma^{+/+}$ y $\gamma^{+/-}$. Esto último apoyaría la noción de que los cambios en la activación de las células T haploinsuficientes para CD3 γ se relacionan con una alteración (cuantitativa o cualitativa) en la expresión del TCR $\alpha\beta$ en la superficie celular.

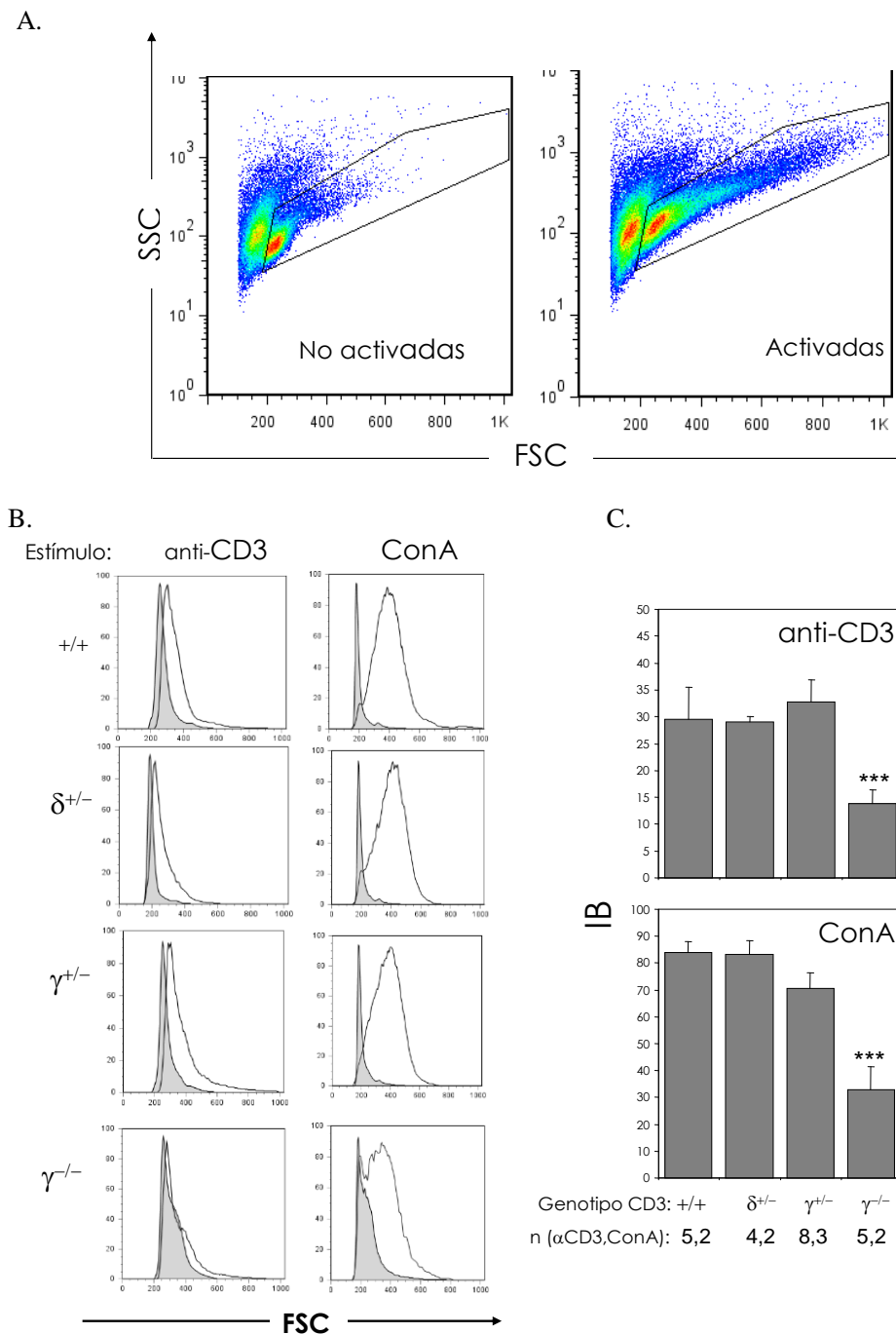


Fig. IV.14. Blastización inducida por activación vía TCR en linfocitos T haploinsuficientes para CD3 γ y CD3 δ **A.** Histogramas de tamaño (FSC) versus complejidad (SSC) de células esplénicas de ratón con distinto genotipo CD3, activados o no con anticuerpo anti-CD3. **B.** Cambios en el tamaño (FSC) de linfocitos T esplénicos estimulados con anticuerpo anti-CD3 (2C11) o ConA (curva blanca), o sin estimular (curva gris). **C.** Índice de blastización (calculado como se indica en Material y métodos). *** $p < 0.001$.

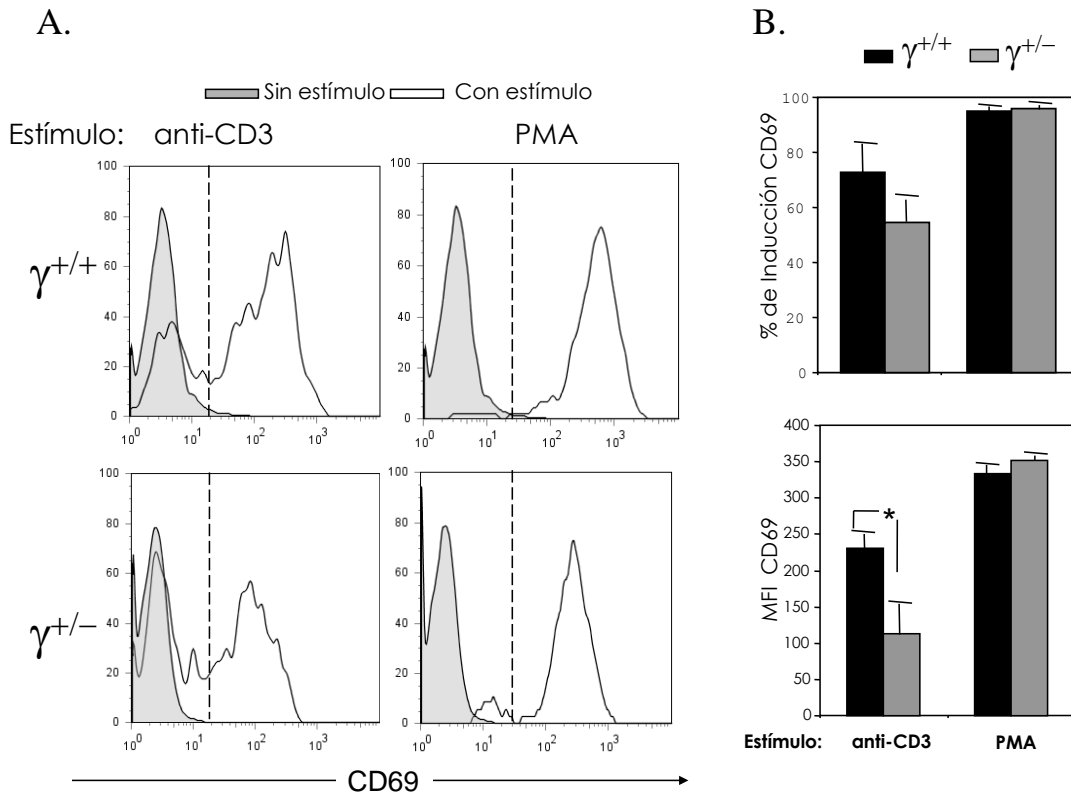


Fig. IV.15. Inducción de CD69 en la haploinsuficiencia de CD3 γ en humanos.
A. Expresión de CD69 en células estimuladas (curva blanca) o sin estimular (curva gris). **B.** Porcentaje de inducción de CD69 (panel superior; ver Material y métodos) y MFI de CD69 (panel inferior) para los genotipos $\gamma^{+/+}$ y $\gamma^{+/-}$, con los distintos estímulos usados; $n=3$; * $p<0.05$.

En el caso de los ratones, la estimulación con anticuerpo anti-CD3 (2C11) resultó en una inducción de CD69 en las células haploinsuficientes para CD3 γ (ó CD3 δ) comparable a la de las células suficientes (Fig. IV.16A), y únicamente las células deficientes de CD3 γ mostraron una respuesta reducida. Sólo al estimular con una cantidad limitante de anticuerpo, las células $\gamma^{+/-}$ fueron claramente inferiores a las $\gamma^{+/+}$ (Fig. IV.16B). Por otra parte, la estimulación con PMA resultó en niveles similares de inducción de CD69 en las células T $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{+/+}$ (datos no mostrados).

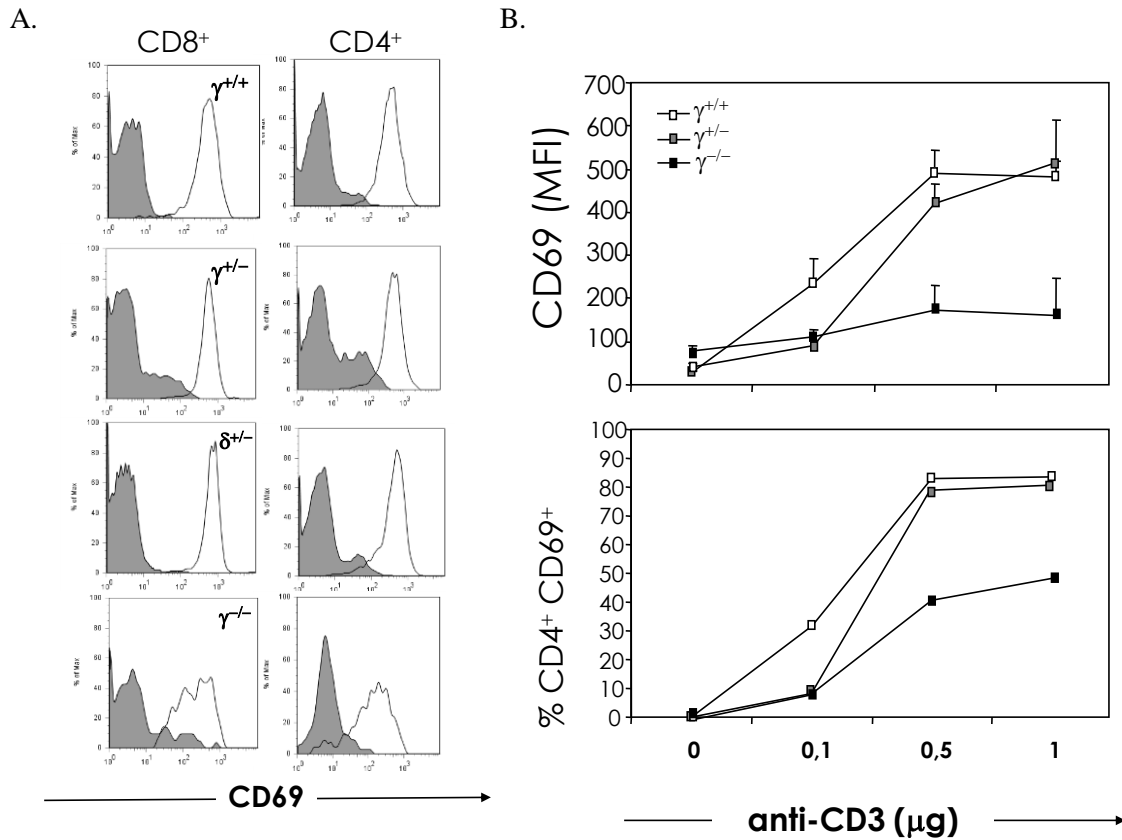


Fig. IV.16. Inducción de CD69 en la haploinsuficiencia de CD3 γ y CD3 δ en ratones. **A.** Expresión de CD69 en células esplénicas no activadas (curva gris) o activadas con 1 μ g de anticuerpo anti-CD3 (curva blanca), dentro de los linajes CD4⁺ y CD8⁺. **B.** Dosis-respuesta de inducción de CD69 en células esplénicas (CD4⁺) $\gamma^{+/+}$, $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$.

También se analizaron en ratones otras moléculas de superficie inducidas tras la activación, como CD5, CD25 o ICOS (Fig. IV.17A), obteniéndose como resultado que las células haploinsuficientes para CD3 γ o CD3 δ son capaces de inducir CD5 y CD25 de forma más marcada o similar, respectivamente, a las células suficientes (Fig. IV.17B). La inducción de ICOS sí que está disminuida de forma significativa en la haploinsuficiencia tanto de CD3 γ como de CD3 δ .

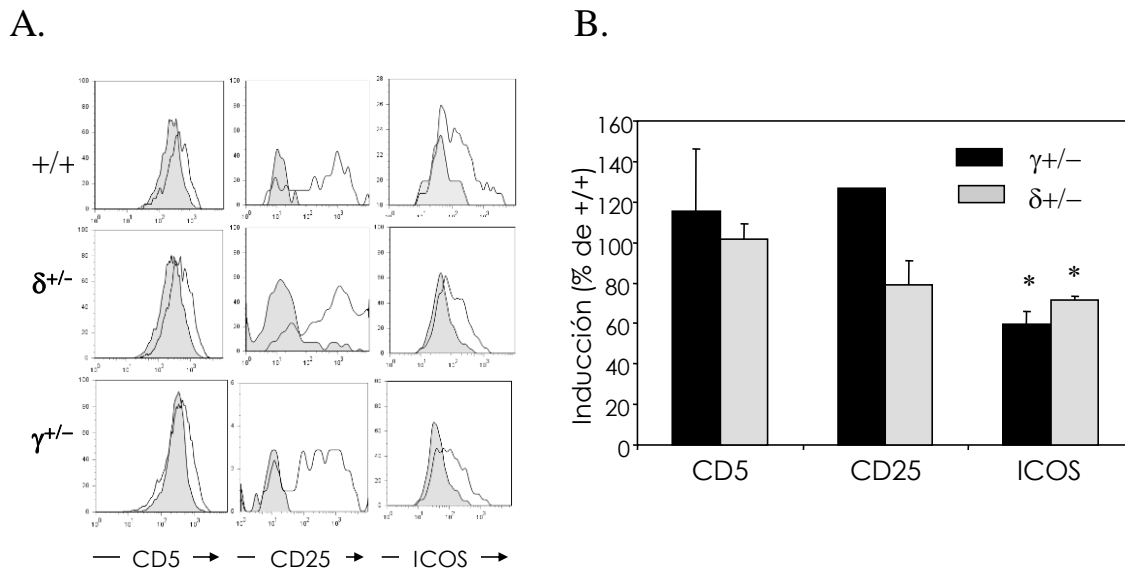


Fig. IV.17. Inducción de CD5, CD25 e ICOS en la haploinsuficiencia de CD3 γ y CD3 δ en ratones (células de bazo). A. Expresión del marcador de activación indicado en células esplénicas no activadas (curva gris) o activadas con 1 μ g de anticuerpo anti-CD3 (curva blanca). B. Inducción de los distintos marcadores en células $\gamma^{+/-}$ y $\delta^{+/-}$ relativa a la de los controles $\gamma^{+/+}$ según fórmula de Material y métodos. $n=3$; * $p<0,05$.

IV.2.2.3 Proliferación.

En el caso de los humanos, se hizo una revisión en la familia 1 (tabla III.1) de la respuesta proliferativa del paciente deficiente de CD3 γ y de sus familiares portadores de la mutación (padres y hermanos), en los análisis realizados anualmente en su hospital de referencia (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid) durante los últimos 20 años. En la tabla IV.1 se muestra el porcentaje de proliferación medio (con respecto a controles normales) en respuesta a distintos estímulos activadores. Los datos se muestran separados en edad adulta e infantil ya que se ha comprobado que, en caso de déficit de proliferación, este es más acusado en niños que en adultos. Este es el caso en los individuos $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$ analizados, en los que se observa un defecto en la proliferación inducida con diversos estímulos, pero con una mejoría con los años (por ejemplo, en respuesta a anti-CD3).

ESTÍMULO	$\gamma^{+/-}$		$\gamma^{-/-}$	
	infantil	adulto	infantil	adulto
CD3	45.9	80.0	32.2	100
IL-2	73.8	85.0	71.4	99.5
ConA	72.2	45.1	---	11.2
PHA	85.2	85.9	20.2	68.7
PMA + Ion	96.4	100	84.2	100
PMA + CD69	78.8	82.2	24.9	84
PMA + CD3	47.9	72.5	55	89
PMA + CD2	96.3	93.5	84.7	90.1
PMA + CD28	77.9	95.9	71.8	79.8
PMA + CD26	70.1	100	36.3	72.3
CD3 + IL-2	32.7	100	34.5	87.6
CD3 + CD28	36.1	65.8	89.2	100
PHA + IL2	64.9	75.2	36.2	100
PHA + CD28	100	99.1	16.8	n.a
PHA + PMA	76.2	93	42.9	96.1
ConA+IL-2	35.2	45.4	26.9	56.3
CD2 + IL-2	79.8	100	89.2	100
PWM	81.9	100	83.6	100
PWM + PMA	86.7	77.1	58.6	97.2
Enterotoxina A	60.2	93.3	82.7	100
Enterotoxina C1	40.4	75.4	71.8	100

Tabla IV.1. Proliferación de linfocitos en la haploinsuficiencia y deficiencia de CD3 γ en humanos. Se muestra el porcentaje de proliferación medio con respecto a los controles del día de distintos individuos $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$, utilizando distintos estímulos y combinaciones de éstos. n.a: no analizado.

Adicionalmente, se realizaron experimentos de proliferación en PBL ó en células transformadas con el virus HTLV-1 de los tres genotipos de CD3 γ , estimuladas con anticuerpo anti-CD3 ó PMA (Fig. IV.18A). Los resultados muestran que las células $\gamma^{+/-}$ proliferan menos que las $\gamma^{+/+}$ en respuesta a anti-CD3, lo que contrasta con lo observado al estimular con PMA, en los que no hay diferencias significativas entre las células suficientes, haploinsuficientes o deficientes de CD3 γ .

En el caso de los ratones, los resultados obtenidos son similares ya que en respuesta a la estimulación con anticuerpo anti-CD3 (2C11), tanto las células $\gamma^{+/-}$ como $\delta^{+/-}$ proliferan significativamente menos que los controles (Fig. IV.18B). Estas diferencias no se observan usando PMA más ionomicina como estímulo.

Para profundizar en este aspecto, se prepararon cultivos con un número fijo de células de bazo de ratón que fueron activadas con ConA e IL-2 (Fig. IV.18C). Tras seis días de cultivo, se cuantificó el número de células post-estimulación. Esta aproximación permitió distinguir además, por citometría de flujo, el tipo celular que prolifera en cada caso. Así, se pudo corroborar el defecto significativo en proliferación de las células $\gamma^{+/-}$, en particular de las células CD4 $^{+}$.

IV.2.2.4 Modulación del TCR inducida por PMA

La estimulación de los linfocitos T con ésteres de forbol (activadores de la PKC, como el PMA) altera los niveles de expresión del TCR, incrementando su internalización sin la concomitante degradación (Boyer et al., 1991), siendo esta internalización estrictamente dependiente de la región intracelular de CD3 γ (Dietrich et al., 1997). En este contexto, se pretendió analizar el efecto del PMA sobre los linfocitos T $\gamma^{+/-}$. Para ello, se emplearon células humanas de los tres genotipos de CD3 γ transformadas con HVS (Fig. IV.19). Tras el tratamiento estándar con PMA (20 ng durante 30 minutos), se observó que las células haploinsuficientes eran capaces de

internalizar su TCR de manera comparable a las células suficientes. Las células deficientes, como ya había sido descrito con anterioridad (Dietrich et al., 1994; Wegener et al., 1995), tienen afectada esta función ya que la modulación del complejo es completamente dependiente de la presencia de la región intracelular de CD3 γ , que es donde se encuentran los motivos di-leucina responsables de esta función.

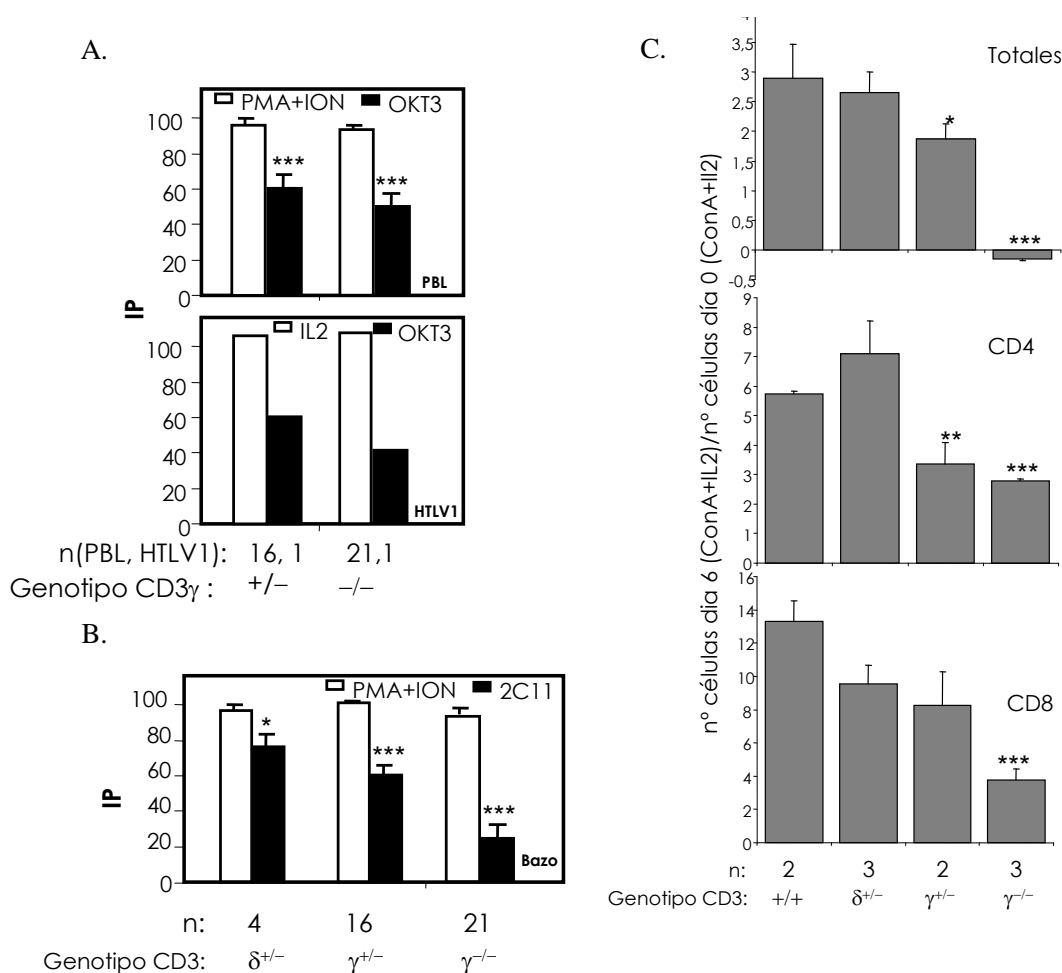


Fig. IV.18. Proliferación de linfocitos T en la haploinsuficiencia de CD3 γ y CD3 δ . **A.** Índice de proliferación (medida por incorporación de timidina tritiada) de células humanas $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$ (con respecto a controles $\gamma^{+/+}$) estimuladas con anticuerpo anti-CD3 (OKT3), PMA+Ionomicina, o IL-2. PBL (panel superior); células transformadas con HTLV-1 (panel inferior). **B.** Índice de proliferación de células esplénicas de ratones $\delta^{+/-}$, $\gamma^{+/-}$, $\gamma^{-/-}$ estimuladas con anti-CD3 (2C11) o con PMA+Ionomicina. **C.** Proliferación de células esplénicas de ratón en respuesta a ConA+IL-2 medida como número de veces que aumenta el número celular en un cultivo durante 6 días. Se mide proliferación en células totales, CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

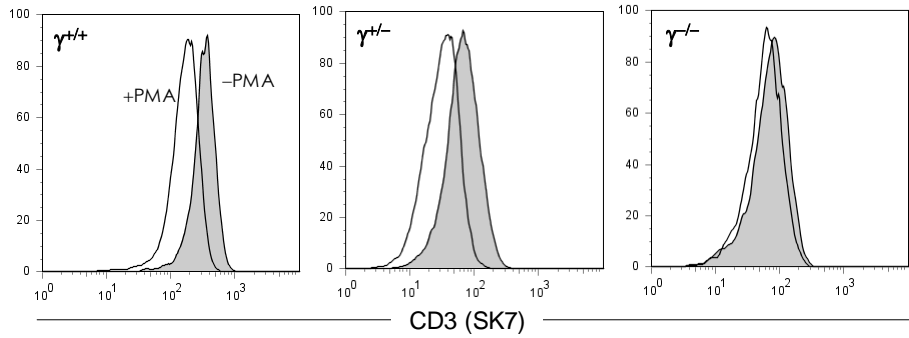


Fig. IV.19. Modulación del TCR inducida por PMA en células HVS haploinsuficientes o deficientes de $CD3\gamma$. Expresión de CD3 en la superficie de células HVS $\gamma^{+/+}$, $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$, tratadas o no con PMA.

En el caso de los ratones, para analizar la modulación del TCR inducida por PMA se procedió a realizar una cinética de cuatro horas con un punto de análisis cada hora (Fig. IV.20), observándose que si bien al cabo de la primera hora las células $\gamma^{+/-}$ (o $\delta^{+/-}$) apenas modulan el receptor en comparación con las células $\gamma^{+/+}$, es cuestión de tiempo que alcancen valores de modulación normales. Así, a las cuatro horas ya modulan el TCR en superficie como las células suficientes. Como en los humanos, las células de ratón deficientes de $CD3\gamma$ son incapaces de modular el receptor tras el tratamiento con PMA.

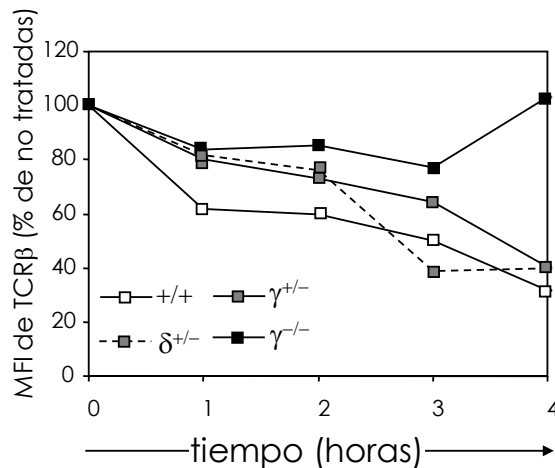


Fig. IV.20. Modulación del TCR inducida por PMA en la haploinsuficiencia de $CD3\gamma$ y $CD3\delta$ en ratones. Expresión del TCR (MFI relativa a la de células no tratadas) medida con un anticuerpo anti-TCR β a distintos intervalos de tiempo tras el estímulo con PMA.

IV.2.2.5 Modulación del TCR inducida con anticuerpo anti-CD3

La estimulación de los linfocitos T con anticuerpos dirigidos contra el TCR (anti-TCR β o anti-CD3) reduce el número de receptores en la superficie celular (Luton et al, 1997; Lauritsen et al., 1998) y constituye una aproximación más parecida a la situación fisiológica que la obtenida con los ésteres de forbol.

En el caso de los humanos, este tipo de modulación se analizó en células primarias (PBL) y se observó que los linfocitos T $\gamma^{+/-}$ internalizan el TCR en respuesta a anti-CD3 de forma comparable a las células T $\gamma^{+/+}$ (Fig. IV.21).

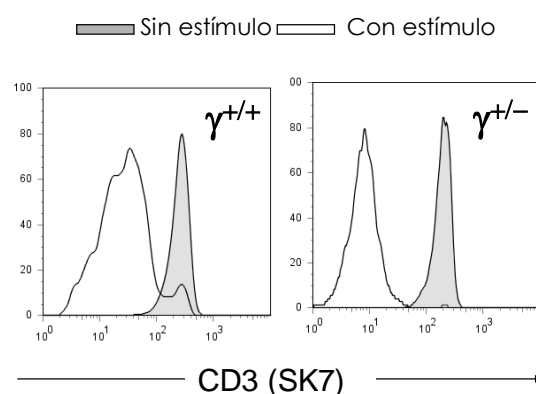


Fig. IV.21. Modulación del TCR inducida con anticuerpo anti-CD3 en PBL humanas haploinsuficientes para CD3 γ . Expresión de CD3 en células CD4 $^{+}$ $\gamma^{+/+}$ y $\gamma^{+/-}$ estimuladas con anticuerpo anti-CD3 (UCHT-1) durante 16h (curva blanca). En gris se representa la tinción antes del estímulo.

En el caso de los ratones, las células haploinsuficientes para CD3 γ (o CD3 δ) son capaces de modular el TCR en respuesta a anti-CD3 de forma similar a como lo hacen las células suficientes, tanto las del linaje CD8 $^{+}$ como las CD4 $^{+}$, aunque estas últimas con menor eficacia (Fig. IV.22). En cambio las células deficientes, como ya se había descrito anteriormente (Haks et al., 2001), apenas modulan el TCR de superficie en respuesta al tratamiento con anticuerpo anti-CD3.

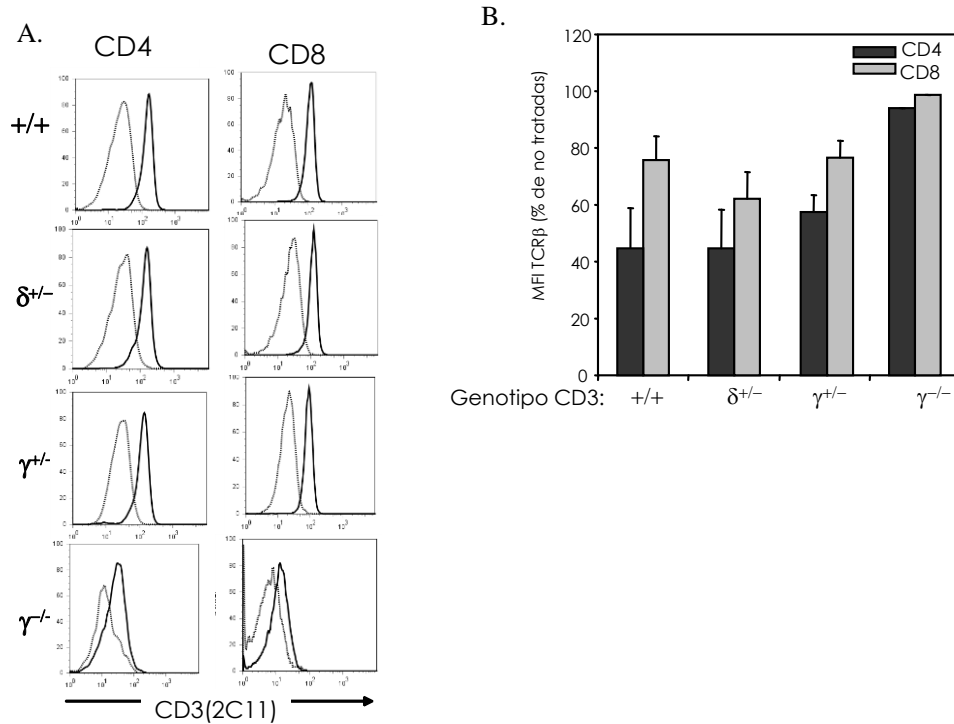


Fig. IV.22. Modulación del TCR inducida con anticuerpo anti-CD3 en ratones haploinsuficientes para CD3γ y CD3δ. **A.** Expresión de TCRβ dentro de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ esplénicas, antes (línea oscura) o 16 horas después de la estimulación con anticuerpo anti-CD3 (2C11). **B.** Expresión de TCRβ en células esplénicas cultivadas 16h en presencia de anticuerpo anti-CD3 (MFI relativa a células no tratadas).

IV.2.2.6 Producción de citocinas

Una de las funciones más importantes de los linfocitos T es la de sintetizar y secretar diversas citocinas con las que dirigir y coordinar la respuesta inmunitaria celular y humoral (Paul y Seder, 1994). Por ello, analizamos la capacidad de síntesis de citocinas de las células T γ^{+/-} tras la estimulación vía TCR, usando citometría de flujo intracelular (Fig. IV.23A).

Así, tal y como se muestra en la Figura IV.23B, la inducción de citocinas de tipo Th1, Th2 y Th17 está claramente afectada en las células provenientes de ratones $\gamma^{+/-}$ con respecto a la observada en las células de animales $\gamma^{+/+}$ o $\delta^{+/-}$.

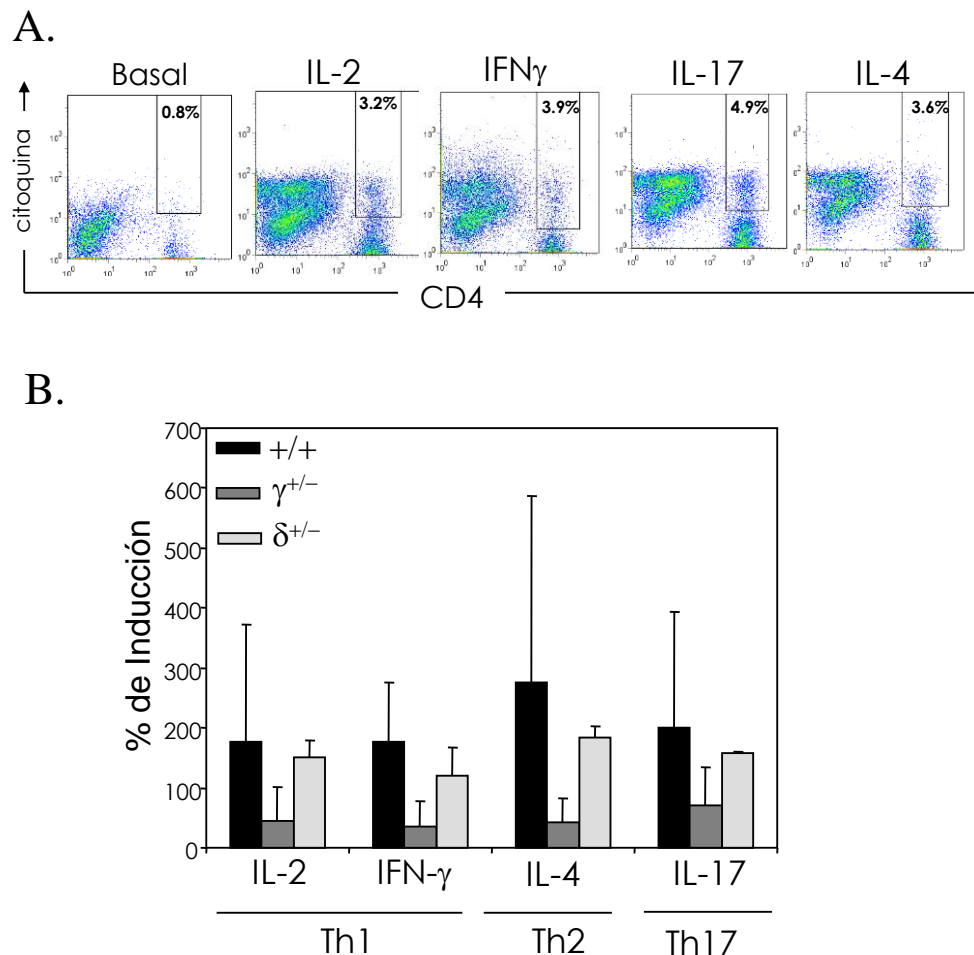


Fig. IV.23. Inducción de citocinas en la haploinsuficiencia de $CD3\gamma$ y $CD3\delta$ en ratones. **A.** Histogramas representativos de cómo se han seleccionado las células positivas para cada una de las citocinas tras la estimulación con anti-cuerpo anti-CD3. Basal: IL-2 en células no estimuladas. **B.** Inducción de citocinas (ver Material y métodos) en células esplénicas estimuladas con anticuerpo anti-CD3 durante 48h.

En el caso de los humanos, las limitaciones en la disponibilidad de células y reactivos permitió sólo el análisis de las citocinas IL-2 y TNF- α (Fig. IV.24), observándose un déficit marcado (alrededor del 50%) en la inducción de IL-2, pero no en la de TNF- α , en las células $\gamma^{+/-}$ con respecto a las células $\gamma^{+/+}$.

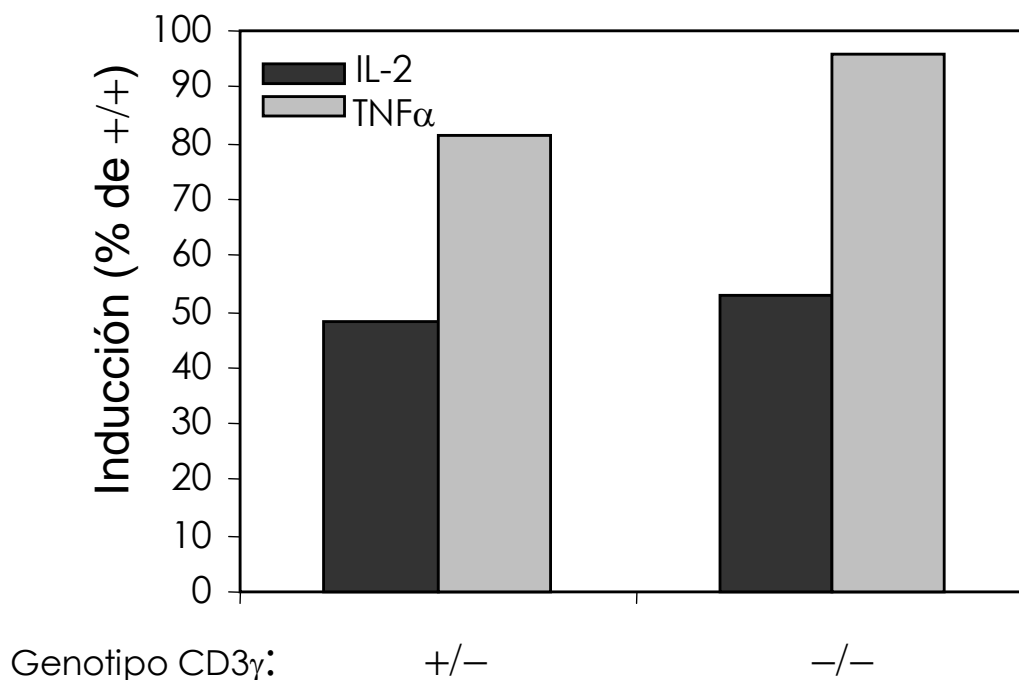


Fig. IV.24. Inducción de citocinas en la haploinsuficiencia y deficiencia de CD3γ en humanos. Inducción de citocinas en PBL $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$ respecto a células control $\gamma^{+/+}$, tras la estimulación con anticuerpo anti-CD3.

IV.2.2.7 Flujo de calcio

Uno de los eventos más tempranos que tienen lugar en la célula T tras su activación vía TCR es la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico hacia el citoplasma, donde actúa posteriormente como segundo mensajero fundamental en el proceso global de activación (Imdoben y Stobo, 1985). Tal y como se muestra en la Figura IV.25, tras la estimulación con anticuerpo anti-CD3, las células HVS $\gamma^{+/-}$ exhiben niveles intermedios de flujo de calcio en comparación con las células $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$, lo que indica que tanto la deficiencia como la haploinsuficiencia de CD3γ resulta en un déficit en este evento temprano de señalización.

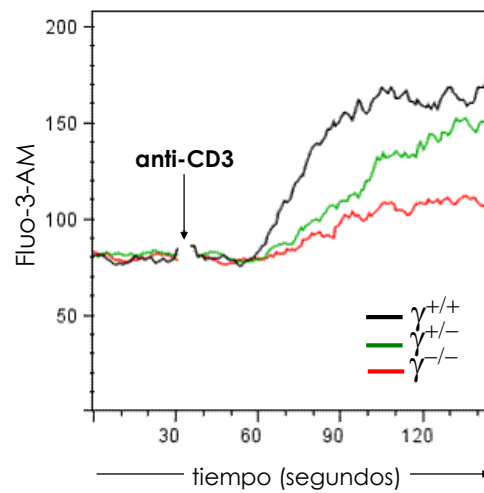


Fig. IV.25. Movilización de Ca^{2+} en la haploinsuficiencia y deficiencia de $\text{CD3}\gamma$ en humanos. Ensayo realizado en células HVS estimuladas con anticuerpo anti- CD3 (UCHT-1) (ver Material y métodos).

V. Discusión

Entre las sub-unidades CD3 que componen los receptores de antígeno de los linfocitos T (TCR), CD3 γ y CD3 δ son las que exhiben el mayor grado de homología. Los genes que codifican estas cadenas en mamíferos provienen de un gen ancestral de aves y anfibios, estando aún por determinar si CD3 γ y CD3 δ desempeñan funciones específicas o redundantes, o ambas, como componentes del TCR.

El impacto de la deficiencia de CD3 γ y CD3 δ ha sido ampliamente estudiado tanto en humanos como en modelos de ratones deficientes. En contraste, en una y otra especie, es poco lo que se conoce sobre los efectos de la haploinsuficiencia de CD3 en la expresión funcional del TCR.

En el presente trabajo, la caracterización de los individuos portadores de mutaciones nulas en CD3 en heterocigosis (haploinsuficientes), tanto humanos como ratones manipulados genéticamente, ha revelado un fenotipo claramente diferente al de los individuos sin mutación. En el caso de los humanos hay que resaltar que, en lo que a clínica se refiere, no se ha observado ninguna anomalía aparte de una mayor incidencia de infecciones de repetición en la infancia. El cuadro clínico bastante difuso y de etiología dispar hace que se consideren de manera general como individuos sanos. Este hecho es lo esperado teniendo en cuenta la genética que subyace a la mutación, cuya herencia es autosómica recesiva y por lo tanto la presencia de un alelo mutado no supone padecer la enfermedad. Sin embargo, y como se desprende de los resultados de este trabajo, los individuos haploinsuficientes para CD3 exhiben rasgos característicos que hacen que se encuentren, en ciertos aspectos fenotípicos y funcionales, en una situación intermedia entre los individuos suficientes y los deficientes.

V.1 IMPACTO DE LA HAPLOINSUFICIENCIA DE CD3 EN LA EXPRESIÓN DEL TCR

En los humanos haploinsuficientes para CD3 γ , se produce una reducción del orden del 40% en la expresión intracelular de esta cadena en los linfocitos T $\alpha\beta$, determinada por citometría de flujo empleando anticuerpos específicos. Utilizando marcaje metabólico e inmunoprecipitación, Thomassen y colaboradores (2006) observaron que en individuos heterocigotos para una mutación nula en CD3 γ (familiares de un paciente deficiente) se produce una reducción en los niveles de expresión de esta cadena (aunque no lo cuantifican), en comparación con un familiar no portador de la mutación.

En relación a los individuos haploinsuficientes para CD3 δ , aunque no fue posible evaluar por citometría de flujo la expresión intracelular de esta cadena, el estudio de los familiares de dos nuevos pacientes con una deficiencia parcial de *CD3D* ($\delta^{+/leaky}$; Gil et al., 2011), mostró una disminución de alrededor del 30% en la expresión intracelular de CD3 δ (Muñoz-Ruiz et al., 2013).

En el caso de los ratones, la haploinsuficiencia de CD3 γ resulta en una reducción en la expresión de este gen (cuantificada por citometría intracelular) similar a la observada en humanos. Recientemente, estos resultados han sido corroborados a nivel de ARN mensajero y proteína, tanto en los ratones haploinsuficientes para CD3 γ como para aquellos con haploinsuficiencia de CD3 δ (Muñoz-Ruiz et al., datos no publicados). Por tanto, la expresión de solo un alelo de CD3 γ o CD3 δ compromete la expresión de estas proteínas en los linfocitos T.

El decremento en la expresión génica de *CD3G* o *CD3D* observado en la situación de haploinsuficiencia tiene efectos de distinta magnitud, en humanos y ratones, en la expresión del TCR en la superficie de los linfocitos T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$. Así, la haploinsuficiencia de CD3 γ en humanos resulta en una reducción de 20-25% en la expresión del TCR $\alpha\beta$ y de alrededor de 40% en la del TCR $\gamma\delta$, en comparación con individuos suficientes; mientras que la expresión del TCR en ambos linajes de células T

está mucho menos afectada en la haploinsuficiencia de CD3 δ . Una tendencia similar se observa en el caso de los ratones haploinsuficientes. Por tanto, en humanos y ratones, la haploinsuficiencia de CD3 γ parece tener mayor impacto que la de CD3 δ en la expresión del TCR en la superficie celular.

El impacto de la haploinsuficiencia de CD3 γ en la expresión en superficie del TCR $\alpha\beta$ es incluso mayor en células transformadas, en comparación con células primarias. Esto puede ser debido al hecho de que la inmortalización con HVS o HTLV-I genera un repertorio oligoclonal con menor representación de la variabilidad que se encuentra de manera natural en PBL (Mittrücker et al., 1993). Aún así, los estudios de barrido epitópico en las células haploinsuficientes para CD3 pueden ser de interés, ya que nos pueden ayudar a identificar aquellos anticuerpos más adecuados para realizar los estudios en los familiares de pacientes deficientes, con el fin de identificar individuos haploinsuficientes.

Los mecanismos subyacentes a la disminución de la expresión en superficie del TCR en la haploinsuficiencia de CD3 γ (o CD3 δ) se desconocen. Tratándose de un receptor multimérico, se podría especular que la disminución en la abundancia de una de uno de los componentes, por ejemplo CD3 γ , pudiese afectar las propiedades globales del receptor (“propiedades emergentes”) debido a cambios en los otros componentes (Arnaud et al., 1997). De hecho, en las células T $\gamma\delta$ de ratón, donde CD3 γ está presente por partida doble en el receptor, la activación vía TCR se asocia a una glicosilación diferencial de CD3 (Hayes y Love, 2006). En linfocitos T $\alpha\beta$ humanos, el patrón de glicosilación de la cadena CD3 δ es diferente cuando CD3 γ está ausente por completo (Pérez-Aciego et al, 1991; Zapata et al. 1999). Una glicosilación anormal de CD3 δ se ha observado también en ratones deficientes de CD3 δ /CD3 γ que expresan un transgén humano de CD3 δ (Fernández-Malavé et al., 2006), y en ratones haploinsuficientes para CD3 γ , y de forma más marcada, en ratones haploinsuficientes dobles para CD3 γ y CD3 δ (Muñoz-Ruiz et al., datos no publicados). De este modo, la abundancia relativa de CD3 γ podría regular la exposición de las otras cadenas del TCR (en particular la de la altamente homóloga CD3 δ) a la maquinaria intracelular de glicosilación, lo que a su vez generaría versiones de CD3 con tendencia a ser degradadas (Maecker y Levy, 1988), o que se podrían ensamblar en un TCR que, aunque se pueda expresar en la membrana, sería estructuralmente menos estable debido a las alteraciones en la

interacción entre sus cadenas constituyentes. De hecho, en los casos arriba mencionados donde se observa una glicosilación aberrante de CD3 δ , esta fue acompañada de una asociación más lábil de CD3 ζ al TCR de superficie. Por otra parte, en células T humanas haploinsuficientes para CD3 γ , tanto CD3 ζ como CD3 δ están más débilmente asociadas al complejo TCR $\alpha\beta$ de superficie en comparación con las células suficientes (Crespo-Guardo, Tesis Doctoral; 2009).

Cualquiera que sea el mecanismo responsable del impacto de la haploinsuficiencia de CD3 γ en la expresión del TCR en la superficie celular, éste parece depender, directa o indirectamente, de los niveles de expresión génica de *CD3G*, ya que la introducción (con un vector retroviral) de un cDNA de CD3 γ en células HVS haploinsuficientes (o deficientes) restituye la expresión del TCR en superficie casi a niveles normales (Crespo-Guardo, Tesis Doctoral; 2009).

El impacto de la haploinsuficiencia de CD3 en la expresión del TCR parece depender del tipo de TCR, $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, y de la especie analizada, humanos *versus* ratones. Los TCR, tanto humanos como murinos, se ensamblan formando complejos octaméricos a partir de cuatro bloques diméricos: TCR $\alpha\beta$ (o TCR $\gamma\delta$), CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ y $\zeta\zeta$. La unión de éstos depende de forma crítica de aminoácidos ionizables situados en la región transmembrana de cada dímero (Wucherpfennig et al., 2010). Por otra parte, los ectodominios de CD3 $\gamma\epsilon$ y CD3 $\delta\epsilon$ contribuyen de manera adicional a la estabilidad del complejo. Las interacciones entre las cadenas del receptor son distintas en función de la especie. Así, por ejemplo, el TCR $\gamma\delta$ de ratón no incorpora dímeros CD3 $\delta\epsilon$, y en su lugar presenta dos dímeros CD3 $\gamma\epsilon$. En contraste, el TCR $\gamma\delta$ humano sí incorpora ambos dímeros, CD3 $\delta\epsilon$ y CD3 $\gamma\epsilon$ (Siegers et al. 2007).

La proteína CD3 γ de los mamíferos tiene en su ectodominio una porción plegada que encaja en un bucle asimétrico de la sub-unidad TCR β . Esta interacción es indispensable para el óptimo ensamblaje del TCR $\alpha\beta$ y su posterior expresión. Dado que CD3 δ no posee esta región, no es capaz de reemplazar de forma efectiva a CD3 γ debido a un impedimento parcial de tipo estérico. Lo anterior tiene consecuencias en la función del receptor (Kim et al., 2010), que se ponen de manifiesto, por ejemplo, en la deficiencia absoluta de CD3 γ . Tal peculiaridad probablemente conduce a la asimetría

estructural (presencia de dímeros CD3 $\delta\epsilon$ y CD3 $\gamma\epsilon$) que comparten el TCR $\alpha\beta$ humano y el de ratón. Por el contrario, la cadena TCR γ carece del bucle asimétrico de su homólogo TCR β , lo cual la hace menos restrictiva en lo que se refiere a la interacción con dímeros CD3. Esto resulta especialmente relevante a la hora de incorporar dímeros CD3 en el complejo TCR $\gamma\delta$, lo que podría explicar la estequiometría dispar de este receptor en humanos y ratones.

El presente trabajo sugiere la existencia de limitaciones estructurales distintas para el ensamblaje y estabilización del TCR $\alpha\beta$ *versus* el TCR $\gamma\delta$, tal y como lo revela el impacto diferencial en la expresión del receptor en la superficie celular cuando son confrontados, en una situación de haploinsuficiencia, a una menor cantidad de CD3 γ o de CD3 δ .

Para explicar este impacto diferencial, proponemos un modelo simplificado de ensamblaje (Fig. V.1; Muñoz-Ruiz et al., 2013) que combina de manera sistemática los hallazgos descritos en la literatura con los datos obtenidos de nuestro estudio de las haploinsuficiencias de CD3. Según este modelo, en un primer paso de ensamblaje se uniría el dímero CD3 $\delta\epsilon$ al dímero TCR ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$), y en un segundo paso se incorporaría el dímero CD3 $\gamma\epsilon$. Este dímero a su vez se uniría con mucha más afinidad (flecha gruesa en la figura) que CD3 $\delta\epsilon$ a la cadena TCR β , gracias al bucle asimétrico del que hablábamos con anterioridad (en negro sobre TCR β en la figura) y que encaja preferencialmente con CD3 $\gamma\epsilon$. En el caso del ensamblaje del TCR $\gamma\delta$, al carecer la cadena TCR γ de la porción de anclaje preferencial a CD3 $\gamma\epsilon$, la incorporación de este dímero estaría menos favorecida (flecha punteada) que en el caso del TCR $\alpha\beta$. Puesto que los dímeros CD3 $\delta\epsilon$ tienen una afinidad similar por TCR α y TCR δ (paso 1; flecha fina), en caso de una expresión reducida de CD3 δ (como en la haploinsuficiencia) se daría un impacto similar en ambos tipos de TCR. Por el contrario, cuando CD3 γ es limitante por haploinsuficiencia, la ausencia de la estructura de unión con CD3 $\gamma\epsilon$ en TCR γ favorecería la incorporación de los dímeros CD3 $\delta\epsilon$ más abundantes a los complejos TCR $\gamma\delta$ nacientes (paso 2), generándose en última instancia receptores TCR $\gamma\delta$ carentes de la estabilidad necesaria para una óptima expresión en la superficie celular. Además, es necesario resaltar que la cadena TCR δ humana (pero no TCR α)

puede reclutar de forma estable no sólo CD3 $\delta\epsilon$ sino también CD3 $\gamma\epsilon$ (Alibaud, 2001) durante el paso 1, lo cual podría reducir aún más la disponibilidad de dímeros CD3 $\gamma\epsilon$ para el paso 2 cuando CD3 γ es limitante.

Se requieren más estudios para demostrar una relación directa entre la disponibilidad de CD3 γ o CD3 δ y el ensamblaje y posterior expresión en superficie del TCR. Sin embargo, la escasez de individuos haploinsuficientes puede dificultar estos estudios en seres humanos.

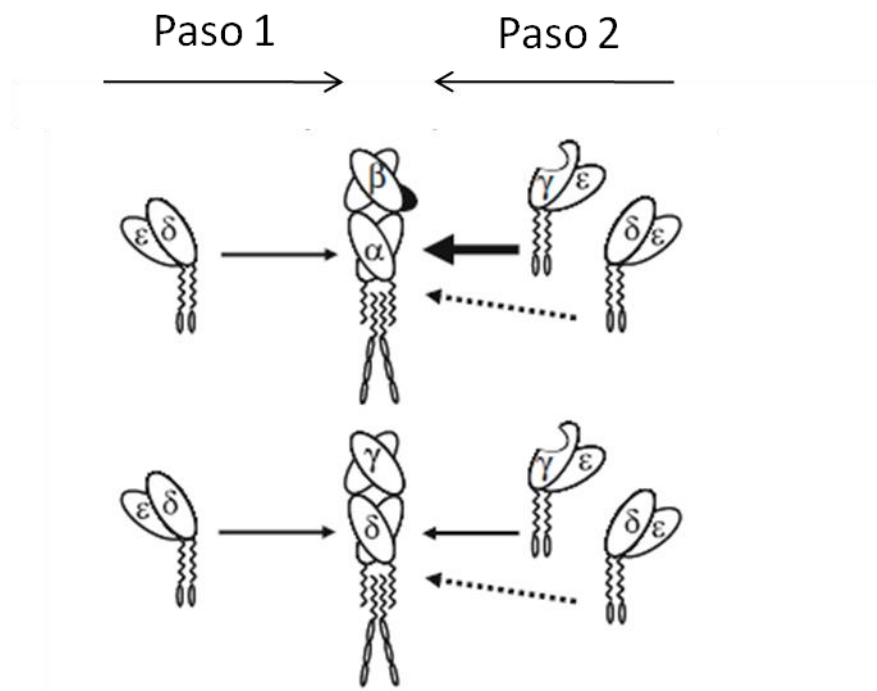


Fig. V.1. Modelo de ensamblaje secuencial del TCR humano (Muñoz-Ruiz et al. 2013).

V. 2 IMPACTO DE LA HAPLOINSUFICIENCIA DE CD3 EN LA FUNCIÓN DEL TCR

El análisis pormenorizado de los resultados de esta Tesis nos permite afirmar que la haploinsuficiencia de CD3 debe tener algún efecto sobre el desarrollo en el timo de las células T.

Para entender tales efectos, hay que recordar las diferencias en la composición de los TCR de humanos y ratones, y el papel del TCR durante el desarrollo en el timo, tal y como lo ha revelado el análisis de las deficiencias de CD3 en ambas especies (Fig. V2). Así, la falta de la cadena CD3 δ da lugar al bloqueo completo del desarrollo de los linfocitos T $\alpha\beta$ tanto en humanos como en ratones, aunque en distintos estadios de desarrollo (Dave et al., 1997; Dadi et al., 1993). En humanos pero no en ratones (Berger et al., 1997), CD3 δ resulta esencial para la expresión funcional del pre-TCR y la consecuente transición DN-DP durante el desarrollo T $\alpha\beta$ temprano. Curiosamente, la situación se invierte en el caso de la deficiencia de CD3 γ , la cual afecta la expresión funcional del pre-TCR en el ratón (Haks et al., 1998) pero no en los humanos (Soudais et al., 1993).

En el ratón la deficiencia completa de las distintas cadenas CD3 ha demostrado que el desarrollo de las células T se ve alterado en todas las situaciones, aunque en diversos puntos de control y en diferente grado. Todas las proteínas CD3, excepto CD3 δ , son necesarias para la selección β mediada por el pre-TCR. Cabe destacar que estas diferencias también se encuentran en el desarrollo del linaje T $\gamma\delta$, donde la deficiencia de CD3 δ (que no forma parte del TCR $\gamma\delta$ del ratón pero sí del receptor humano) tiene efectos muy distintos en humanos y ratones. Este hecho hace que en células humanas, pero no en ratón, en ausencia de CD3 δ no se generen timocitos DP ni células T $\gamma\delta$. Por el contrario, los ratones pero no los humanos que carecen de CD3 γ tienen muy pocas células T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$ periféricas.

Del presente trabajo se desprende que no sólo la deficiencia absoluta de las cadenas CD3 afecta al desarrollo de los linfocitos T, sino que también la limitación en la disponibilidad de las mismas, causada por su haploinsuficiencia, afecta en mayor o

menor medida la selección y maduración en el timo. En este sentido, es de particular interés la alteración en la proporción de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ en los individuos haploinsuficientes para $CD3\gamma$, que además se manifiesta de forma distinta en humanos y ratones. En una situación normal, la frecuencia de linfocitos T $CD4^+$ duplica a la de T $CD8^+$ (Thibault et al. 1995). Sin embargo, en los humanos haploinsuficientes, una disminución en la frecuencia de células T $CD8^+$ resulta en un aumento de la proporción $CD4^+/CD8^+$, mientras que en los ratones haploinsuficientes esta proporción disminuye a expensas de un aumento en la frecuencia de células T $CD8^+$. Los mecanismos implicados en este impacto diferencial de la haploinsuficiencia de $CD3\gamma$ en el desarrollo de las células T $CD4^+$ versus $CD8^+$, aunque se desconocen, podrían estar relacionados con un requerimiento diferencial de expresión/señalización del $TCR\alpha\beta$ para la selección positiva y/o compromiso de linaje de las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ en el timo (Egawa, 2015), requerimiento que sería distinto en humanos y ratones.

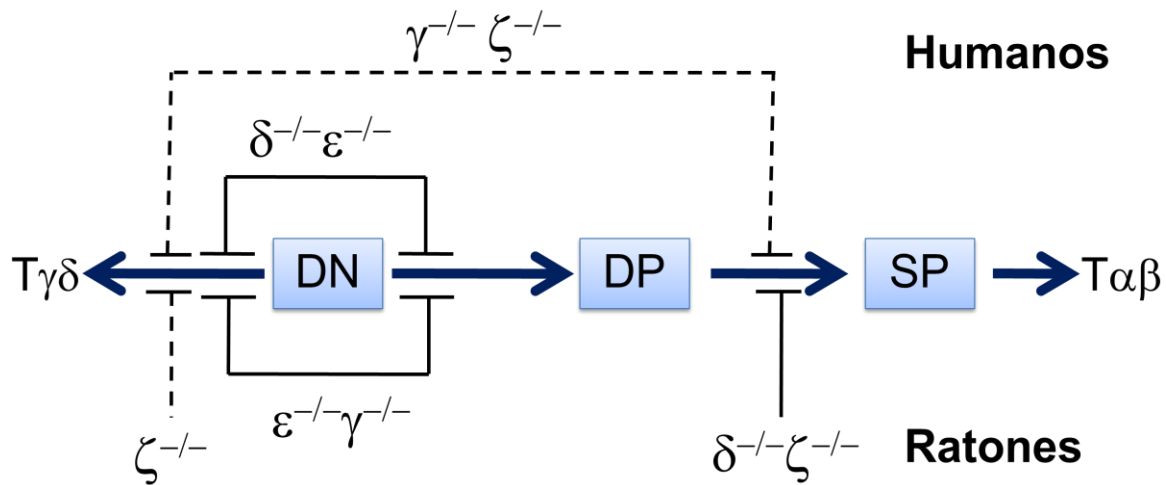


Fig. V.2. Impacto de las deficiencias de $CD3$ en el desarrollo de las células T en humanos y ratones. El impacto se representa como completo (línea continua) o parcial (línea discontinua). DN= Doble Negativo, DP= Doble Positivo, SP= simple positivo, refiriéndose a los distintos estadios de desarrollo de los linfocitos T. Adaptado de Recio et al., 2007.

En lo relativo al impacto de la haploinsuficiencia de CD3 en la activación vía TCR de los linfocitos T maduros, se estudiaron distintos eventos de activación en células T $\alpha\beta$ humanas haploinsuficientes para CD3 γ , o en células T $\alpha\beta$ provenientes de ratones haploinsuficientes para CD3 γ o CD3 δ .

Inducción de moléculas de activación temprana:

La inducción de moléculas de activación, como CD69, se ha empleado para medir la activación temprana vía TCR, siendo un parámetro bastante sensible a los cambios en la densidad del receptor en la superficie celular (Testi et al., 1989^a, 1989^b). En nuestro caso, la inducción de CD69 tras la activación con anticuerpo anti-CD3 se ve moderadamente afectada tanto en humanos como en ratones haploinsuficientes para CD3 γ , aunque en estos últimos, el defecto se corrige al usar altas concentraciones del anticuerpo estimulador. Esto indicaría que la alteración en la inducción de CD69 está asociada al descenso en la expresión del TCR en la superficie celular. En apoyo de este argumento, cuando las células T haploinsuficientes son tratadas con PMA, un estímulo independiente del TCR de superficie, la inducción de CD69 en los individuos haploinsuficientes, humanos o ratones, es comparable a la de los controles suficientes.

Proliferación celular:

El estudio retrospectivo de proliferación celular en la familia española con las mutaciones en *CD3G* resultó muy interesante, ya que permitió evaluar cómo esta función puede ser afectada por la haploinsuficiencia en comparación con la deficiencia absoluta, y su evolución con la edad. Este análisis de la familia en cuestión, puso de manifiesto una afectación en los hermanos portadores (haploinsuficientes) similar al del individuo deficiente: proliferación disminuida a estímulos TCR-dependientes puros (anti-CD3) pero normal a estímulos TCR-independientes (PMA + Ionomicina). Estos resultados fueron confirmados en células transformadas con HTLV-I. La evolución de la afectación con la edad también mostró un patrón similar, ya que los portadores de la mutación tenían defectos de proliferación cuando eran niños, que se corrigieron cuando superaron la infancia, del mismo modo que le ocurrió al hermano deficiente superviviente. El defecto en la proliferación inducida vía TCR también se observó en

los ratones haploinsuficientes para CD3 γ , confirmándose así el impacto de la haploinsuficiencia de esta cadena sobre un parámetro de gran relevancia clínica.

Modulación del complejo en la superficie celular:

La modulación del TCR de la superficie celular inducida por ésteres de forbol (por ejemplo, PMA) es unívocamente dependiente de la presencia de CD3 γ , en cuyo tallo intracelular se encuentran los motivos di-leucina responsables de esta función (Dietrich et al., 1994; Wegener et al., 1995). La internalización mediada por ésteres de forbol no deja de ser un artificio, pero nos permite evaluar indirectamente la internalización dependiente de la quinasa PKC (von Essen et al., 2006). En nuestro caso, vimos como a un tiempo estándar después del tratamiento con PMA, las células T haploinsuficientes para CD3 γ (tanto humanas como de ratón) se comportan como los controles suficientes en cuanto a la modulación del TCR. Esto era en cierta forma lo esperado, puesto que aunque el receptor se exprese en menor cantidad en la superficie de las células haploinsuficientes, este sigue teniendo cadenas CD3 γ con capacidad de mediar la internalización PKC-dependiente. Debe señalarse, sin embargo, que esta modulación del receptor se produce con retraso en las células haploinsuficientes múridas, sugiriendo que el número de cadenas CD3 γ (asociadas al TCR de superficie) está implicado en la regulación temporal de la modulación del receptor inducida con PMA.

La modulación del TCR inducida por anticuerpos monoclonales anti-CD3, un estímulo TCR-dependiente, no está afectada por la haploinsuficiencia de CD3 γ , ni en humanos ni en ratones. En estos últimos, la haploinsuficiencia de CD3 δ tampoco parece interferir con este tipo de modulación del receptor. Este fenómeno no tiene, al igual que ocurría con los ésteres de forbol, un valor fisiológico real puesto que, *in vivo*, difícilmente la célula T se encontrará con anticuerpos anti-CD3 circulantes (salvo en determinadas circunstancias de intervención terapéutica; Ströhlein MA et al., 2009). En su conjunto, los datos obtenidos indican que pese a estar limitada la disponibilidad de CD3 γ en los individuos haploinsuficientes, una vez que es expresado el receptor en la superficie, este conserva la capacidad de internalizarse tras la interacción con ligando.

Producción de citocinas:

Se han descrito varios casos de inmunodeficiencias con números normales de linfocitos T, pero con defectos en la activación que afectan la producción de citocinas (Disanto et al., 1990; Chatila et al., 1990; Weinberg et al., 1990; Castigli et al., 1993). Sin embargo, el defecto subyacente en la mayoría de los casos aún se desconoce.

La expresión de la mayoría de las citocinas está estrictamente regulada. En general, no se detecta una producción constitutiva significativa de estas moléculas, siendo necesaria la activación celular para que se produzcan en cantidades suficientes para ejercer sus efectos biológicos. Son moléculas que poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones, del orden de picogramos, mediante la unión a receptores de alta afinidad presentes en la superficie de la propia célula productora o en otras estirpes celulares (Moser y Willimann, 2004).

La síntesis y liberación de citocinas es un evento relativamente tardío, pues se produce 24-48 horas tras la activación de la célula. El patrón de producción de estas proteínas depende del linaje en cuestión, del tipo de estímulo, y de otras circunstancias del entorno (por ejemplo, la abundancia de hormonas, patología, etc.). En este trabajo, hemos analizado el impacto de la haploinsuficiencia de CD3 en la inducción vía TCR de la síntesis de citocinas Th1, Th2 y Th17 en ratones, y Th1 en humanos. En las dos especies, las células T haploinsuficientes para CD3 γ muestran una tendencia a producir una menor cantidad de citocinas que los controles suficientes, tras la estimulación con anticuerpo anti-CD3. En los ratones, la haploinsuficiencia de CD3 δ afecta en menor magnitud la producción de citocinas post-activación en comparación con la haploinsuficiencia de CD3 γ . En particular, la inducción de IL-2 vía TCR se encuentra disminuida de forma marcada en las células haploinsuficientes de ratones y humanos. De hecho, en las últimas la disminución es comparable a la observada en las células deficientes. Este efecto de la haploinsuficiencia de CD3 γ en la síntesis de IL-2 puede estar relacionado con el defecto en la proliferación de los linfocitos T haploinsuficientes, ya que la IL-2 es un mediador crítico de la proliferación de las células del linaje T. Sin embargo, la expresión génica de CD3 γ no parece afectar de forma genérica a la inducción de citocinas Th1, por lo menos en humanos, ya que la

inducción de TNF- α está prácticamente preservada tanto en las células haploinsuficientes como en las deficientes de CD3 γ .

Flujo de calcio intracelular:

El flujo de Ca²⁺ se activa como consecuencia de la estimulación vía TCR, y ocurre gracias a la liberación al citosol del Ca²⁺ almacenado en el retículo endoplásmico. El incremento resultante de Ca²⁺ en el citosol es imprescindible para la activación y proliferación de la célula T, así como para la regulación de la expresión génica de citocinas (Feske, 2007). Un flujo de Ca²⁺ alterado se ha descrito previamente en algunas inmunodeficiencias primarias (Feske et al., 2001; Feske et al., 2005; leDeist et al., 1995). Otra prueba de la importancia de un flujo de Ca²⁺ correcto en la inmunidad la encontramos en el papel que juegan ciertas mutaciones en los componentes de esta ruta, capaces de ocasionar clínica de inmunodeficiencia grave (Feske et al., 1996 y 2006; Picard et al., 2009).

Nuestro análisis de la inducción de flujo de Ca²⁺ vía TCR demostró que no sólo está afectado en las células T humanas deficientes de CD3 γ , sino también en las células haploinsuficientes, las cuales mostraron una inducción intermedia entre la de las células deficientes y suficientes. Curiosamente, estos resultados son concordantes con lo que ocurre en el déficit de ORAI1 (Feske et al., 2010), una proteína que participa del ciclo del flujo de calcio. En esta patología, que cursa con inmunodeficiencia grave, se da el caso de que los portadores heterocigotos de la mutación (sin clínica alguna y con números normales de linfocitos T) tienen un flujo de Ca²⁺ disminuido significativamente con respecto a los controles correspondientes.

Características funcionales tan distintivas de los individuos haploinsuficientes, como ocurre con el flujo de Ca²⁺ en la haploinsuficiencia de ORAI1 o de CD3 γ , podría ser una herramienta útil para identificar la existencia de individuos portadores o incluso para el mapeo de defectos génicos en otras enfermedades raras.

En su conjunto, nuestro análisis del impacto de la haploinsuficiencia de CD3 γ (y de CD3 δ en algunos casos) en la función del TCR ha revelado alteraciones, algunas no

esperadas, que pueden tener relevancia en el desarrollo de patología. En este sentido, la supervivencia de los ratones haploinsuficientes para CD3 γ o CD3 δ está severamente comprometida tras la infección poli-microbiana generada por CLP (*Cecal Ligation and Punction*; Muñoz-Ruiz et al., manuscrito en preparación), un modelo fuertemente dependiente de la función de las células T. En cualquier caso, queda por determinar si las alteraciones en la función del TCR causadas por la haploinsuficiencia de CD3 se relacionan directamente con la disminución en la densidad del receptor en la superficie celular (Labrecque et al., 2001), o si derivan de cambios cualitativos en las cadenas CD3 (por ejemplo, glicosilación anormal), los cuales a su vez podrían afectar la estabilidad del complejo y su expresión en la superficie celular; comprometiendo en último término la capacidad de señalización del TCR y la función de las células T.

VI. Conclusiones

1. La haploinsuficiencia de CD3 en humanos y ratones, y no sólo su deficiencia, tiene un impacto en el desarrollo y función de los linfocitos T debido a sus efectos en la expresión y funcionalidad del TCR.
2. La expresión en superficie del TCR $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$, tanto en humanos como en ratones, es afectada en mayor grado por la haploinsuficiencia de CD3 γ que por la de CD3 δ .
3. En humanos, pero no en ratones, el impacto de la haploinsuficiencia de CD3 γ y CD3 δ en la expresión del TCR depende del tipo de TCR. Este hecho sugiere la existencia de limitaciones estructurales diferentes para el ensamblaje, estabilización y expresión del TCR $\alpha\beta$ *versus* el TCR $\gamma\delta$.
4. La haploinsuficiencia de CD3 γ , y en menor medida la de CD3 δ , afecta el desarrollo en el timo de las células T $\alpha\beta$ CD4⁺ y CD8⁺, alterando la proporción CD4⁺/CD8⁺, pero con un impacto diferencial en humanos y ratones. Esto sugiere un requerimiento diferencial de expresión y/o señalización del TCR para la selección tímica de las células CD4⁺ *versus* CD8⁺, que es aparentemente distinto en ratones y humanos. Los mecanismos subyacentes se desconocen.
5. En los linfocitos T $\alpha\beta$ maduros, ni la modulación del TCR ni la activación temprana vía TCR son afectadas de forma crítica por la haploinsuficiencia de CD3 γ (en humanos y ratones) o de CD3 δ (en ratones). Sin embargo, eventos tardíos de activación, como la producción de IL-2 o la proliferación celular, se ven afectados por la haploinsuficiencia de CD3 γ en ambas especies. En ratones, la haploinsuficiencia de CD3 δ afecta la proliferación pero no la síntesis de IL-2.
6. Las alteraciones en la función del TCR $\alpha\beta$ causadas por la haploinsuficiencia de CD3 podrían ser el resultado de la disminución de la expresión del receptor en la superficie celular, o alternativamente, de cambios cualitativos en las sub-unidades CD3 (por ejemplo, glicosilación anormal), los cuales a su vez podrían afectar la estabilidad, la expresión en superficie y la capacidad de señalización del receptor. Por otra parte, en un contexto clínico, la detección de los cambios en la expresión funcional del TCR asociados al estado de haploinsuficiencia podría ser de utilidad para la identificación de individuos portadores de mutaciones en CD3.

VII. Bibliografia

A

- Acton**, R.T., Weinheimer P.F., Hildemann W.H., Evans E.E. 1969. Induced bactericidal response in the hagfish. *J.Bacteriol.* 99(2): 626-28.
- Adams**, E.J., Chien Y.J., 2005. Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22.*Science*.308 (5719):227-31.
- Alarcon**, B., Berkhout B., Breitmeyer J., Terhorst C.1988. Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3-gamma.delta.epsilon core and single T cell receptor alpha or beta chains. *J.Biol.Chem.* 263:2953-61.
- Alarcon**, B., Gil D., Delgado P., Schamel W.W., 2003.Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. *Immunol.Rev.* 191:38-46.
- Alcover**, A., Mariuzza R.A., Ermonval M., Acuto O. 1990. Lysine 271 in the transmembrane domain of the T-cell antigen receptor beta chain is necessary for its assembly with the CD3 complex but not for alpha/beta dimerization. *J.Biol.Chem.* 265:4131-35
- Alcover** A., Alarcon B.. 2000. Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev.Immunol.* 20:325-346.
- Alibaud** L., Arnaud J., Llobera R., Rubin B. 2001. On the role of CD3delta chains in TCRgammadelta/CD3 complexes during assembly and membrane expression. *Scand J Immunol.* 54(1-2):155-62.
- Allende**, L. M., Hernandez, M., Corell, A., Garcia-Perez, M. A., Varela, P., Moreno, A., Caragol, I., Garcia-Martin, F., Guillen-Perales, J., Olive, T., Espanol, T., Arnaiz-Villena, A. 2000. A novel CD18 genomic deletion in a patient with severe leucocyte adhesion deficiency: a possible CD2/lymphocyte function-associated antigen-1 functional association in humans *Immunology*99,440-450
- Altare**, F., Durandy, A., Lammas, D., Emile, J. F., Lamhamedi, S., Le Deist, F., Drysdale, P., Jouanguy, E., Doffinger, R., Bernaudin, F., Jeppsson, O., Gollob, J. A., Meinel, E., Segal, A. W., Fischer, A., Kumararatne, D., Casanova, J. L. 1998. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency *Science*280,1432-1435
- Alvarez-Zapata**, D., de Miguel Olalla, S., Fontan, G., Ferreira, A., Garcia-Rodriguez, M. C., Madero, L., van den Elsen, P., Regueiro, J. R. 1998 Phenotypical and functional characterization of Herpesvirus saimiri-immortalized human major histocompatibility complex class II-deficient T lymphocytes. *Tissue Antigens*51,250-257
- Aoe** T., Ohno H., Sonta S., Saito T.. 1993. Functional inactivation of the CD3 zeta chain in a T cell hybridoma by in vitro gene targeting. *Int. Immunol.* 5:725-33.
- Ardouin**, L., Boyer C., Gillet A., Trucy J., Bernard A.M., Nunes J., Delon J., Trautmann A., He H.T., Malissen B., Malissen M.. 1999. Crippling of CD3-zeta ITAMs does not impair T cell receptor signaling. *Immunity.* 10:409-20
- Ariga** T, Oda N., Sanstesteban I., Arredondo-Vega F-X, Shioda M., Ueno H., Terada K., Kobayashi K., . Hershfield M.S, Sakiyama Y. 2001. Molecular Basis for Paradoxical Carriers of Adenosine Deaminase (ADA) Deficiency That Show Extremely Low Levels of ADA Activity in Peripheral Blood Cells Without Immunodeficiency. *J. Immunol.*166:3 1698-1702
- Arnaiz-Villena**, A., Timon M., Corell A., Perez-Aciego P., Martin-Villa J.M., Regueiro J. R. 1992. Brief report: primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3-gamma subunit of the T-lymphocyte receptor. *N.Engl.J.Med.* 327:529-33.
- Arnaud**, J., Huchenq, A., Vernhes M.C., Caspar-Bauguil S., Lenfant, F., Sancho, J., Terhorst, C., and Rubin, B. 1997.*Int. Immunol.* 9, 615–626

Arnett K.L., Harrison S.C., Wiley D.C. 2004. Crystal structure of a human CD3-epsilon/delta dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 101:162-68.

Arstila, T.P., Casrouge A., Baron V., Even J., Kanellopoulos J., Kourilsky P.. 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286:958-61

Ashwell J.D., Klausner R.D. 1990. Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 8:139-67.

B

Backstrom B.T., Milia E., Peter A., Jaureguiberry B., Baldari C.T., and Palmer E.. 1996. A motif within the T cell receptor alpha chain constant region connecting peptide domain controls antigen responsiveness. *Immunity*. 5:437-47

Baniyash, M., Garcia-Morales P., Bonifacino J.S., Samelson L.E., Klausner R.D. 1988. Disulfide linkage of the zeta and eta chains of the T cell receptor. Possible identification of two structural classes of receptors. *J. Biol. Chem.* 263:9874-78.

Baniyash M., Hsu V.W., Seldin M.F., Klausner R.D. 1989. The isolation and characterization of the murine T cell antigen receptor zeta chain gene. *J Biol Chem.* 264(22):13252-57.

Berger MA, Dave VP, Rhodes MR, Bosma GC, Bosma MJ, Kappes DJ, et al. 1997 Subunit composition of pre-T cell receptor complexes expressed by primary thymocytes: CD3-delta is physically associated but not functionally required. *J Exp Med.* 186:1461-7.

Bierer, B.E. and Burakoff S.J.. 1989. T-lymphocyte activation: the biology and function of CD2 and CD4. *Immunol. Rev.* 111:267-294.

Blumberg R.S., Ley S., Sancho J., Lonberg N., Lacy E., McDermott F., Schad V., Greenstein J. L., Terhorst C.. 1990. Structure of the T-cell antigen receptor: evidence for two CD3 epsilon subunits in the T-cell receptor-CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87:7220-24.

Bolliger L., Johansson B., and Palmer E. 1997. The short extracellular domain of the T cell receptor zeta chain is involved in assembly and signal transduction. *Mol. Immunol.* 34:819-27

Bonifacino, J.S., Chen C., Lippincott-Schwartz J., Ashwell J. D., Klausner R.D. 1988. Subunit interactions within the T-cell antigen receptor: clues from the study of partial complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85:6929-33

Bonifacino, J. S., Suzuki C. K., J. Lippincott-Schwartz, A. M. Weissman, R. D. Klausner. 1989. Pre-Golgi degradation of newly synthesized T-cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly. *J. Cell Biol.* 109:73-83.

Borst , J. Coligan JE, Oettgen H, Pessano S, Malin R, Terhorst C. 1985. The delta- and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. *Nature*. 312 (5993):455-58

Borst, J., Brouns G. S., de Vries E., Verschuren M.C., Mason D.Y., van Dongen J.J.. 1993. Antigen receptors on T and B lymphocytes: parallels in organization and function. *Immunol. Rev.* 132:49-84

Boyer, C., Auphan N., Luton F., Malburet J.M, Barad M., Bizozzero J.P., Reggio H., a Schmitt-Verhulst A.M.. 1991. T cell receptor/CD3 complex internalization following activation of a cytolytic T cell clone: evidence for a protein kinase C-independent staurosporine-sensitive step. *Eur. J. Immunol.* 21:1623-34.

Brenner M.B., McLean J., Dialynas D.P., Strominger JL, Smith JA, Owen FL, Seidman J.G., Ip S., Rosen F., Krangel M.S. 1986. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature*. 322(6075):145-49

Brodeur J.F., Li S., Silva Martins M., Larose L., Dave V.P. 2009. Critical and multiple roles for the CD3ε intracytoplasmic tail in double negative to double positive thymocyte differentiation. *J. Immunol.* 182:4844-53

Broker, B. M., Kraft, M. S., Klauenberg, U., Le Deist, F., de Villartay, J. P., Fleckenstein, B., Fleischer, B., Meinel, E. 1997. Activation

induces apoptosis in Herpesvirus saimiri-transformed T cells independent of CD95 (Fas, APO-1) *Eur. J. Immunol.* 27;2774-2780

C

Cabanillas, J. A., Cambroner, R., Pacheco-Castro, A., Garcia-Rodriguez, M. C., Martin-Fernandez, J. M., Fontan, G., Regueiro, J. R. 2002. Characterization of Herpesvirus saimiri-transformed T lymphocytes from common variable immunodeficiency patients *Clin. Exp. Immunol.* 127;366-373

Call M.E., Pyrdol J., Wiedmann M., Wucherpfennig K.W.. 2002. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111:967-79.

Call M.E., Wucherpfennig K.W. 2004a. Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. *Mol. Immunol.* 40:1295-1305.

Call M.E., Wucherpfennig K.W. 2004b. The T Cell Receptor: Critical Role of the Membrane Environment in Receptor Assembly and Function. *Annu. Rev. Immunol.*

Call M.E., Schnell J.R., Xu C., Lutz R.A., Chou J.J., Wucherpfennig K.W. 2006. The structure of the zeta-zeta transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor. *Cell.* 20;127(2):355-68.

Cantrell, D.A., Davies A.A., Crumpton M.J.. 1985. Activators of protein kinase C down-regulate and phosphorylate the T3/T-cell antigen receptor complex of human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:8158-8162.

Cantrell, D.A., Davies A.A., Verbi W., Crumpton M.J.. 1987. The regulation of T-cell proliferation: a role for protein kinase C. *Haematol. Blood Transfus.* 31:341-346.

Carson G.R., Kuestner R.E., Ahmed A., Pettey C.L., Concino M.F.. 1991. Six chains of the human T cell antigen receptor. CD3 complex are necessary and sufficient for processing the

receptor heterodimer to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 266:7883-87.

Caspar-Bauguil, S., Arnaud J., Gouaillard C., Hou X., Geisler C., and Rubin B.. 1994. Functionally important amino acids in the TCR revealed by immunoselection of membrane TCR-negative T cells. *J. Immunol.* 152:5288- 98.

Castigli E, Pahwa R, Good RA, Geha RS, Chatila TA. 1993. Molecular basis of a multiple lymphokine deficiency in a patient with severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*;90:4728-32.

Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Geha RS. 2005. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet.* ;37(8):829-34.

Chan, A.C., Iwashima M., Turck C.W., and Weiss A.. 1992. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71:649-62.

Chatila T, Castigli E, Pahwa R, Pahwa S, Chirmule N, Oyaizu N, Good RA, Geha RS. 1990. Primary combined immunodeficiency resulting from defective transcription of multiple T-cell lymphokine genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*;87:10033-7.

Chen, C., Bonifacino J.S., Yuan L.C., Klausner R.D. 1988. Selective degradation of T cell antigen receptor chains retained in a pre-Golgi compartment. *J. Cell Biol.* 107:2149-2161.

Chien M.L., Foster J.L., Douglas J.L. Garcia J.V. 1997. The amphotropic murine leukemia virus receptor gene encodes a 71-kilodalton protein that is induced by phosphate depletion. *J Virol.* 71(6):4564-70.

Clayton L.K., D'Adamio L., Howard F.D., Sieh M., Hussey R.E., Koyasu S, Reinherz E.L. 1991. CD3 eta and CD3 zeta are alternatively spliced products of a common genetic locus and are transcriptionally and/or post-transcriptionally regulated during T-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88(12):5202-06

Clevers, H., Alarcon B., Wileman T. Terhorst C. 1988. The T cell receptor/CD3 complex: a

dynamic protein ensemble. *Annu.Rev.Immunol.* 6:629-62

Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K.,1997. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J. Pediatr.*, 130(3):388–93.

Cosson P., Lankford S.P., Bonifacio J.S., Klausner R.D.. 1991. Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature* 351:414-416

Crespo-Guardo A. 2009. Impacto fenotípico y funcional de quimeras de CD3 γ y CD3 δ en el complejo TCR/CD3 humano deficiente de CD3 γ . Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral

D

Dadi, H.K., Simon A.J., Roifman C.M. 2003. Effect of CD3delta deficiency on maturation of alpha/beta and gamma/delta T-cell lineages in severe combined immunodeficiency. *N.Engl.J.Med.* 349:1821-28

Das H., Wang L., Kamath A., Bukowski J.F. 2001. V γ 2V δ 2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates. *Blood.* 98(5):1616-18.

Dave, V.P., Cao Z., Browne C., Alarcon B., Fernandez-M, Kappes D.J.. 1997. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *EMBO J.* 16:1360-70.

Dave V.P. 2009. Hierarchical role of CD3 chains in thymocyte development. *Immunol. Rev.* 232(1):22–33.

Davis, M.M. 1990. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu.Rev.Biochem.* 59:475-96.

Davies A.A., Cantrell D.A., Hexham J. M., Parker P.J., Rothbard J., Crumpton M.J. 1987. The human T3 gamma chain is phosphorylated at serine 126 in response to T lymphocyte activation. *J.Biol.Chem.* 262:10918-10921

Davis, M.M., Chien Y..1993. Topology and affinity of T-cell receptor mediated recognition of peptide-MHC complexes. *Curr.Opin.Immunol.* 5:45-49.

Davis M.M. and Bjorkman P.J. 1988.T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* 4:334(6181):395-402. Review.

de Jarnette J.B., Sommers C.L., Huang K., Woodside K.J., Emmons R., Katz, K., Shores E.W., Love P.E. 1998. Specific requirement for CD3epsilon in T development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(25):14909–14914.

de la Hera A, Müller U, Olsson C, Isaaz S, Tunnacliffe A.1991. Structure of the T cell antigen receptor (TCR): Two CD3epsilon subunits in a functional TCR/CD3 complex. *J Exp Med.* 173:7–17.

de Saint Basile.G. Geissmann F., Flori E., Uring-Lambert B., Soudais C., Cavazzana-Calvo M., Durandy A., Jabado N., Fischer A., and Le Deist F..2004. Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *J.Clin.Invest* 114:1512-1517.

Delon J., Bercovici N., Liblau R., and Trautmann A. 1998.Imaging antigen recognition by naive CD4+ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response. *Eur.J.Immunol.* 28:716-729.

Di FioreP.P. ,Gill G.N.. 1999. Endocytosis and mitogenic signaling. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:483-488.

Dietrich J., Hou X., Wegener A.M., Geisler C. 1994. CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *EMBO J.* 13:2156-66.

Dietrich J., Neisig A., Hou X., Wegener A.M., Gajhede M. and Geisler C.. 1996. Role of CD3 gamma in T cell receptor assembly. *J.Cell Biol.* 132:299-310

Dietrich, J., Kastrup J, Nielsen B. L., Odum N., Geisler C.. 1997. Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site

for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J.Cell Biol.* 138:271-81

Dietrich J., Backstrom T., Lauritsen J. P., Kastrup J., Christensen M.D., von Bulow F., Palmer E., Geisler C.. 1998b. The phosphorylation state of CD3gamma influences T cell responsiveness and controls T cell receptor cycling. *J.Biol.Chem.*273:24232-24238.

DiSanto JP, Keever CA, Small TN, Nicols GL, O'Reilly RJ, Flomenberg N. 1990. Absence of interleukin 2 production in a severe combined immunodeficiency disease syndrome with T cells. *J Exp Med*;171:1697-704

Dulude G., Cheynier R., Gauchat D., Abdallah A., Kettaf N., Sékaly R.P. Gratton S. 2008. The

magnitude of thymic output is genetically determined through controlled intrathymic precursor T cell proliferation. *J Immunol.* 1;181(11):7818-24.

Duncan SR, Scott S, Duncan CJ. 2005. Reappraisal of the historical selective pressures for the CCR5-Delta32 mutation. *J. Med. Genet.*42 (3): 205-8

E

Egawa T. 2014.Regulation of CD4 and CD8 coreceptor expression and CD4 versus CD8 lineage decisions. *Adv Immunol.* 2015;125:1-40.. Review.

Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. 1993. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A* 90:720-724.

Exley M., Terhost C., Willeman T. 1991. Structure, assembly and intracellular transport of the T cell receptor for antigen. *Semin.Immunol.* 3(5): 283-297

Exley M., Varticovski L., Peter M., Sancho J. and Terhorst C. 1994. Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor zeta chain is dependent on T cell activation. *J.Biol.Chem.* 269:15140-15146.

Exley M., Wileman T., Mueller B., Terhorst C.. 1995. Evidence for multivalent structure of T-cell antigen receptor complex. *Mol. Immunol.* 32:829-839.

F

Fernández-Malavé E., Wang N., Pulgar M., Schamel W.W.A., Alarcón B., Terhorst C.. 2006. Overlapping functions of human CD3-delta and mouse CD3-gamma in alpha-beta T-cell development revealed in a humanized CD3-gamma deficient mouse. *Blood*.;108:3420-7.

Fernandez-Miguel G., Alarcon B., Iglesias A., Bluethmann H., Alvarez-Mon M., Sanz E., and de la Hera A..1999. Multivalent structure of an alphabeta T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96:1547-1552

Feske S, Muller JM, Graf D, Kroczek RA, Drager R, Niemeyer C, Baeuerle PA, Peter HH,

Schlesier M. 1996 Severe combined immunodeficiency due to defective binding of the nuclear factor of activated T cells in T lymphocytes of two male siblings. *Eur J Immunol*;26:2119-26

Feske S, Giltman J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. 2001. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol*;2:316-24.

Feske S, Prakriya M, Rao A, Lewis RS. 2005 A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med*;202:651-62.

Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS,

Daly M, Rao A. 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*;441:179–85

Feske S. 2007. Calcium signaling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*.7:690–702.

Feske S., Picard C., Fischer A. 2010. Immunodeficiency due to mutations in *ORAI1* and *STIM1*. *Clin Immunol*. 135(2): 169–182

Fischer A., le Deist F., Hacein-Bey-Abina S., Andre-Schmutz I., de Saint Basile G, de Villartay J.P, Cavazzana-Calvo 2005. Severed combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunol. Rev.* 203:98-109

Fremont D.H., Rees W.A., Kozono H. 1996. Biophysical studies of T-cell receptors and their ligands. *Curr Opin Immunol*. 8(1):93-100.

Fuehrer M., Pannicke U., Schuetz C., Jacobsen, E.M., Schulz A., Friedrich W., Schwarz, K., Honig M. 2014. Successful haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in a patient with SCID due to CD3epsilon deficiency: need for IgG-substitution 6 years later. *Klin. Padiatr*. 226(3):149–153.

G

Gallego, M. D., Santamaria, M., Pena, J., Molina, I. J. 1997. Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation *Blood*90,3089-3097

Garcia, K.C., Degano M., Stanfield R.L., Brunmark A., Jackson M.R., Peterson P.A., Teyton L., Wilson I.A. 1996 . An alpha beta T Cell Receptor Structure at 2.5 Å and Its Orientation in the TCR-MHC Complex. *Science* 274(5285): 209-19

Garcia-Perez, M. A., Paz-Artal, E., Corell, A., Moreno, A., Lopez-Goyanes, A., Garcia-Martin, F., Vazquez, R., Pacho, A., Romo, E., Allende, L. M. 2003. Mutations of CD40 ligand in two

patients with hyper-IgM syndrome *Immunobiology*207,285-294

Geisler C., Rubin B., Caspar-Bauguil S., Champagne E., Vangsted A., Hou X., and Gajhede M. 1992. Structural mutations of C-domains in members of the Ig superfamily. Consequences for the interactions between the T cell antigen receptor and the zeta 2 homodimer. *J. Immunol*. 148:3469-77.

Gil J., Busto E.M., Garcillán B., Chean C., Garcia-Rodriguez, M.C. Diaz-Alderete, A. Navarro J., Reiné J., Mencia, A., Gurbindo D., Belendez, C., Gordillo I., Duchniewicz M., Hohne, K., Garcia-Sanchez F., Fernandez-Cruz E., Lopez-Granados E., Schamel W.W., Moreno-Pelayo M.A., Recio M.J., Regueiro J.R. 2011. A leaky mutation in CD3D differentially affects alphabeta and gammadelta T cells and leads to a Talpha beta-Tgamma delta+B+ NK+ human SCID. *J. Clin. Invest*. 121(10):3872–3876.

Gokturk B., Keles S., Kirac, M., Artac H., Tokgoz H., Guner S.N., Caliskan U., Caliskan Z., van der Burg M., van Dongen J., Morgan N.V., Reisli I. 2014. CD3G gene defects in familial autoimmunethyroiditis. *Scand. J. Immunol*. doi: 10.1111/sji.12200.

Gouaillard C., Huchénq-Champagne A., Arnaud J., Chen C.L., Rubin B. . 2001 Evolution of T cell receptor (TCR) alpha beta heterodimer assembly with the CD3 complex. *Eur J Immunol*; 31(12):3798-805.

Groettrup M., Baron A., Griffiths G., Palacios R., von Boehmer H. 1992. T cell receptor (TCR) beta chain homodimers on the surface of immature but not mature alpha, gamma, delta chain deficient T cell lines. *EMBO J*. 11(7):2735-45.

H

Haks M.C., Krimpenfort P., Borst J., Kruisbeek A.M. 1998. The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalpha beta and

TCRgammadelta lineages. *EMBO J.* 17:1871-82.

Haks M.C., Cordaro T.A., van den Brakel J.H.,

Haanen J.B., de Vries E.F., Borst J., Krimpenfort P., Kruisbeek A.M.. 2001. A redundant role of the CD3 gamma-immunoreceptor tyrosine-based activation motif in mature T cell function. *J.Immunol.* 166:2576-2588.

Hall C., Berkhout B., Alarcon B., Sancho J., Wileman T. and C. Terhorst. 1991. Requirements for cell surface expression of the human TCR/CD3 complex in non-T cells. *Int. Immunol.* 3:359-68.

Hara M., Kitani A., Harigai M., Suzuki K., Hirose T., Kawakami M., Kawagae M., and Nakamura H.. 1991. Discrete association of CD3 and CD4 molecules in Tcell stimulation acting through the autologous mixed lymphocyte reaction and the CD3/T-cell receptor complex in human autoreactive T-cell clones. *Scand.J.Immunol.* 33:141-149.

Hassan SW, Doody KM, Hardy S, Uetani N, Cournoyer D, Tremblay ML. 2010. Increased susceptibility to dextran sulfate sodium induced colitis in the T cell protein tyrosine phosphatase heterozygous mouse. *PLoS One.* 5(1): e8868

Hatada H.M., Lu X., Ellen R.L., Green J., Morgenstern J.P., Lou M., Marr C.S., Phillips B.T., Ram M.K., Theriault K., Zoller M.J., Karas J.L. 1995. Molecular basis for interaction of protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T cell receptor. *Nature.* 377:17-38

Hayes, S. M. and P. E. Love. 2002. Distinct structure and signaling potential of the gamma delta TCR complex. *Immunity.* 16:827-838.

Hayes S.M. and Love P.E. 2006Stoichiometry of the murine gammadelta T cell receptor. *J Exp Med.* 203(1):47-52.

Hemmer, B., Stefanova I., Vergelli M., Germain R.N., and Martin R.. 1998. Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and

the quality of early signaling events in human T cells. *J.Immunol.* 160:5807-5814

I

Imboden,J.B.,Stobo J.D. 1985. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. *J. Exp. Med.* 161:446-70

Imboden J.B. and Koretsky G.A.. 1995. Intracellular signalling. Switching off signals. *Curr.Biol.* 5:727-729.

Irving, B.A., Weiss A.. 1991. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64:891-901.

Irving B.A., Chan A.C., Weiss A.. 1993. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J.Exp.Med.* 177:1093-1103.

Isakov N., Wange R.L., Burgess W..H., Watts J. D., Aebersold R., and Samelson L.E.. 1995. ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J.Exp.Med.* 181:375-380.

Itoh Y., Hemmer B., Martin R. Germain R.N.. 1999. Serial TCR engagement and down-modulation by peptide:MHC molecule ligands: relationship to thequality of individual TCR signaling events. *J.Immunol.* 162:2073-2080.

J

Jacinto E., Werlen G., and Karin M.. 1998.Cooperation between Syk and Rac1 leads tosynergistic JNK activation in T lymphocytes. *Immunity.*8:31-41.

Jacobs H., Vandeputte D., Tolkamp L., de Vries E.,Borst J., Berns A. 1994. CD3 components at thesurface of pro-T cells can

mediate pre-T cell development in vivo. *Eur J Immunol.* 24(4):934-9.

Johansson B., Palmer E., and Bolliger L.. 1999. The extracellular domain of the zeta-chain is essential for TCR function. *J.Immunol.* 162:878-885.

John S., Banting G.S., Goodfellow P.N., and Owen M.J.. 1989. Surface expression of the T cell receptor complex requires charged residues within the alpha chain transmembrane region. *Eur.J.Immunol.* 19:335-339.

K

Kabelitz D., Wesch D., Hinz T., 1999. gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer seminars in immunopathology*; 21(1):55-75

Kane L.P., Lin J., Weiss A. 2000. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr.Opin.Immunol.* 12:242-49.

Kappes D.J., Tonegawa S. 1991. Surface expression of alternative forms of the TCR/CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A* 88:10619-23

Kim ST, Touma M, Takeuchi K, Sun ZY, Dave VP, Kappes DJ et al., 2010 Distinctive CD3 heterodimeric ectodomain topologies maximize antigen-triggered activation of alpha beta T cell receptors. *J Immunol* , 185(5):2951-9.

Kirchhausen T., Bonifacino J.S., and Riezman H. 1997. Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9:488-495.

Klausner R.D., Lippincott-Schwartz J., Bonifacino J.S. 1990. The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu Rev Cell Biol.* 6:403-31.

Koning F., Maloy W.L. and J. E. Coligan. 1990. The implications of subunit interactions for the structure of the T cell receptor-CD3 complex. *Eur.J.Immunol.* 20:299-305.

Krissansen G.W., Owen M.J., Verbi W., Crumpton M.J. 1986 Primary structure of the T3 gamma subunit of the T3/T cell antigen receptor complex deduced from cDNA sequences: evolution of the T3 gamma and delta subunits. *EMBO J.* 5(8):1799-808.

Küppers R. 2003. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol.* Oct;3(10):801-12

L

Labrecque N., Whitfield L.S., Obst R., Waltzinger C., Benoist C. Mathis D.. 2001. How much TCR does a T cell need? *Immunity.* 15:71-82.

La Cava A. 2013. Common variable immunodeficiency: two mutations are better than one. *J Clin Invest.* 123(10): 4142-4143.

Latour S. and Veillette A.. 2001. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr.Opin.Immunol.* 13:299-306

Lauritsen, J. P., M. D. Christensen, J. Dietrich, J. Kastrup, N. Odum, and C. Geisler. 1998. Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR. *J.Immunol.* 161:260-67

Le Deist F, Hivroz C, Partiseti M, Thomas C, Buc HA, Oleastro M, Belohradsky B, Choquet D, Fischer A. 1995; A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx. *Blood* 85:1053-62.

Le Deist F., de Saint-Basile G., Rieux-laucat F., Hivroz C., Fischer a. 2007. Expression anomalies of the CD3-TCR complex expression and immunodeficiencies. *Med. Sci.* 23(2):161-6. Review

Letourneur F. and Klausner R.D.. 1992a. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* 255:79-82.

Letourneur F. and Klausner R. D. 1992b. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based

motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69:1143-1157.

Li, H., Lebedeva M.I., Llera A.S., Fields, B.A., Brenner M.B., Maurizza M.B. 1998. Structure of the V δ domain of human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. *Nature*. 391:502-06

Liu, H., Rhodes M., Wiest D.L., Vignali D.A.. 2000. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity*. 13:665-675.

Love P.E., Lee J., Shores E.W.. 2000. Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection. *J.Immunol*. 165:3080-87

Luton, F., M. Buferne, V. Legendre, E. Chauvet, C. Boyer, and A. M. Schmitt-Verhulst. 1997. Role of CD3gamma and CD3delta cytoplasmic domains in cytolytic T lymphocyte functions and TCR/CD3 down-modulation. *J.Immunol*. 158:4162-70

M

Maecker H.T. and Levy R. 1988. Spontaneous T cell antigen receptor variants of a human T leukemia cell line. *J Immunol*. 141: 2994-3002

Malissen, B., Wegener A.M., Hoeveler A, Marguet D.. 1993. Molecular dissection of the T-cell receptor/CD3 complex. *Immunol.Ser*. 59:29-40.

Malissen M., Gillet A., Ardouin L., Bouvier G., Trucy J., Ferrier P., Vivier E., Malissen,B. 1995. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *Embo J*. 14(19):4641-4653.

Malissen B., Ardouin L., Lyn S.Y., Guillet A., and Malissen M. 1999. Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. *Adv. Immunol*. 72:103-148.

Mallabiabarrena A., Fresno M., Alarcon B.. 1992. An endoplasmic reticulum retention

signal in the CD3 epsilon chain of the T-cell receptor. *Nature* 357:593-96.

Manolios N., Bonifacio J.S., Klausner R.D. 1990. Transmembrane helical interactions and the assembly of the T cell receptor complex. *Science* 249:274-77.

Manolios N., Kemp O., and Li Z.G.. 1994. The T cell antigen receptor alpha and beta chains interact via distinct regions with CD3 chains. *Eur.J.Immunol*. 24:84-92.

Marcus N., Takada H., Law J., Cowan, M.J., Gil, J.Regueiro, J.R., Plaza Lopez de Sabando D., Lopez-Granados E., Dalal J., Friedric, W., Manfred H.,Hanson I.C., Grunebaum E., Shearer W.T., Roifman C.M. 2011. Hematopoietic stem cell transplantation for CD3delta deficiency. *J. Allergy Clin.Immunol*. 128(5):1050-1057.

Marie-Cardine A., Schraven B. 1999. Coupling the TCR to downstream signalling pathways: the role of cytoplasmic and transmembrane adaptor proteins. *Cell Signal*. 11:705-12

Marin A.V.M., Garcillán B., Jimenez-reinoso A., Muñoz-Ruiz M, Briones A.C, Fernández-Malavé E, Recio M.J. Regueiro J.R. 2015. Human congenital T-cell receptor disorders. *LymphoSign Journal* 2:1-17

Martin-Fernandez J.M., Cabanillas JA, Rivero-Carmena M, Lacasa E, Pardo J, Anel A, Ramírez-Duque PR, Merino F, Rodríguez-Gallego C, Regueiro JR. 2005 *Herpesvirus saimiri*-transformed CD8_T cells as a tool to

study Chediak-Higashi syndrome cytolytic lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 77(5) 661-668

Matsui K., Boniface J.J., Reay P.A., Schild H., Fazekas de St G.B.,Davis M.M.. 1991. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 254:1788-1791-

Mazariegos M.S., Muñoz-Ruiz M., Reiné J., Garcillan B., Recio M.J., Fernández-Malavé E., Regueiro J.R. 2013. Inmunodeficiencias

congénitas del receptor de antígeno de los linfocitos T. *Immunología*. 32(3):94:101

Mellman I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:575-625.

Merritt, J.E., McCarthy S.A., Davies M.P.A., Moores K.E. 1990. Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca^{2+} in platelets and neutrophils. *Biochem. J.* 269, 513-19

Minami, Y., Samelson L.E., Klausner R.D.. 1987. Internalization and cycling of the T cell antigen receptor. Role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 262:13342- 47.

Mittrücker H.W., Müller-Fleckenstein I., Fleckenstein B, Fleischer B. 1993. Herpes virus saimiri-transformed human T lymphocytes: normal functional phenotype and preserved T cell receptor signalling. *Int Immunol.* 5(8):985-90.

Mombaerts P., Clarke A.R., Rudnicki M.A., Iacomini J., Itoharu, S., Lafaille, J.J., Wang L., Ichikawa Y., Jaenisch R., Hooper M.L., Tonegawa, S. 1992. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature*. 360(6401):225-231.

Morgan N.V., Goddard S., Cardno T.S., McDonald D., Rahman F., Barge D., Ciupek, A., Straatman-Iwanowska A., Pasha S., Guckian M., Anderson G., Huissoon, A., Cant A., Tate, W.P., Hambleton S., Maher E.R. 2011. Mutation in the TCRalpha subunit constant gene (TRAC) leads to a human immunodeficiency disorder characterized by a lack of TCRalphabeta+ T cells. *J. Clin. Invest.* 121(2):695-702.

Morley B.J., Chin K.N., Newton M.E., and Weiss A. 1988. The lysine residue in the membrane-spanning domain of the beta chain is necessary for cell surface expression of the T cell antigen receptor. *J. Exp. Med.* 168:1971-78.

Moser B., Willmann K. 2004. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum*, 6 : 84-89

Muñoz-Ruiz M, Pérez-Flores V, Garcillán B. , Guardo A.C., Mazariegos M.S., Takada H., Allende L.M, Kilic S.S, Sanal O, Roifman C.M., López-Granados E., Recio M.J, Martínez-Naves E., Fernández-Malavé E., Regueiro J.R. 2013. Human CD3 γ , but not CD3 δ , haploinsufficiency differentially impairs $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ surface TCR expression. *BMC Immunology*. 14:3

N

Nakamura, H., Zarycki, J., Sullivan, J. L., Jung, J. U. 2001. Abnormal T cell receptor signal transduction of CD4 Th cells in X-linked lymphoproliferative syndrome *J. Immunol.* 167, 2657-2665

Nicolas L, Monneret G, Debard AL, Blesius A, Gutowski MC, Salles G. 2001. Human gammadelta T cells express a higher TCR/CD3 complex density than alphabeta T cells. *Clin Immunol*, 98(3):358-63.

Niedergang, F., San Jose E., Rubin B., Alarcon B., Dautry-Varsat A., Alcover. 1997. Differential cytosolic tail dependence and intracellular fate of T cell receptors internalized upon activation with superantigen or phorbol ester. *Res. Immunol.* 148:231- 245.

Nossal, G.J. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell*. 76(2):229-39

O

Oda N, Ariga T, Ono S, Kobayashi I, Kawamura N, Okano M, Kobayashi Y, Taniuchi S, Terada K, Kataoka N, Sakiyama Y. 2000. Genetic analysis of two patients with adenosine deaminase (ADA)-deficiency: detection of three novel mutations and characterization of two paradoxical carriers *Arerugi*, 49(12):1173-80.

Ohashi P.S., Mak T.W., Van den Elsen P., Yanagi Y., Yoshikai Y., Calman A.F., Terhorst C., Stobo J.D., Weiss A. 1985. Reconstitution of

an active surface T3/T-cell antigen receptor by DNA transfer. *Nature*. 15-316(6029):606-09.

Orloff D.G., Ra C.S., Frank S.J., Klausner R.D., Kinet J.P. 1990. Family of disulphide-linked dimers containing the zeta and eta chains of the T-cell receptor and the gamma chain of Fc receptors. *Nature*.;347(6289):189-91

Ozgur T.T., Asal G.T., Cetinkaya D., Orhan,D., Kilic S.S., Usta Y., Ozen H., Tezcan I. 2008. Hematopoietic stem cell transplantation in a CD3 gammadeficient infant with inflammatory bowel disease. *Pediatr. Transpl.* 12(8):910-913

P

Pan Q, Brodeur J-F, Drbal K, Dave VP. 2005 Different role for mouse and human CD3-delta-epsilon heterodimer in pre-T cell receptor (pre-TCR) function: human CD3-delta-epsilon heterodimer restores the defective pre-TCR function in CD3-gamma and CD3-gamma-delta deficient mice. *Mol Immunol.*;43:1741-50.

Pancer, Z., M. D. Cooper. 2006. The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 497-518.

Park C.I., Hirono I., Takashi A., 2005. Molecular characterization of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, CD3ε and the evolution of the CD3 cluster. *Dev. Com. Immunol.* 29:123-33

Pasare C, Mukherjee P, Verhoef A, Bansal P, Mendiratta SK, George A, et al. 2001 T cells in mice expressing a transgenic human TCR beta chain get positively selected but cannot be activated in the periphery by signaling through TCR. *Int Immunol.* 13:53-62.

Patel, M.D., Samelson L.E., Klausner R.D.. 1987. Multiple kinases and signal transduction. Phosphorylation of the T cell antigen receptor complex. *J. Biol. Chem.* 262:5831-5838.

Paul W.E., Seder R.A. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 76(2):241-51

Perez-Aciego P., Alarcon B., Arnaiz-Villena A., Terhorst C., Timon M., Segurado O.G., and Regueiro J.R.. 1991. Expression and function of a variant T cell receptor complex lacking CD3-gamma. *J. Exp. Med.* 174:319-326

Pérez-Flores V., Guardo A.C., Rossi N.E., Recio M.J., Reiné J., Regueiro J.R.. 2006. El complejo TCR/CD3: especificidad con flexibilidad. *Inmunología*. 25(1): 50-56.

Pitcher L. A., van Oers N.S. 2003. T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol.* 24:554-60.

Puzas JE, Goodman DB. 1978. A rapid assay for cellular deoxyribonucleic acid. *Anal Biochem* 86: 50-55.

R

Ravichandran K.S., Lee K.K., Songyang Z., Cantley L.C., Burn P., Burakoff S.J.. 1993. Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science* 262:902-905.

Recio M.J., Moreno-Pelayo M.A., Kiliç S.S., Guardo A.C., Sanal O., Allende L., Pérez-Flores V., Mencía A., Modamio-Høybjør S., Seoane E., and Regueiro J.R. 2007. Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. *J. Immunol.* 178(4):2556-2564.

Regueiro, J.R., Arnaiz-Villena A., Ortiz D.L., Martín Villa J.M., Vicario J. L., Pascual-Ruiz V., Guerra-García F., Alcami J., López-Botet M. and J. Manzanares. 1986. Familial defect of CD3 (T3) expression by T cells associated with rare gut epithelial cell autoantibodies. *Lancet* 1:1274-1275.

Reinherz E.L., Meuer S., Fitzgerald K.A., Hussey R.E., Levine H., Schlossman S.F.. 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. *Cell* 30:735-743.

Reinherz, E. L., Acuto O., Fabbi M., Bensussan A., Milanese C., Royer H.D., Meuer

S.C., Schlossman S.F.. 1984. Clonotypic surface structure on human T lymphocytes: functional and biochemical analysis of the antigen receptor complex. *Immunol.Rev.* 81:95- 129.

Reth M. 1992. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 10:97-121

Rieux-Laucat F., Hivroz C., Lim A., Mateo V., Pellier I., Selz F., Fischer A., Le Deist F. 2006. Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T cell deficiency. *N. Engl. J. Med.* 354(18):1913–1921.

Rivero-Carmena, M., Porras, O., Pelaez, B., Pacheco-Castro, A., Gatti, R. A., Regueiro, J. R. 2000 Membrane and transmembrane signaling in Herpesvirus saimiri-transformed human CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes is ATM-independent *Int. Immunol.* 12,927-935

Roberts J.L., Lauritsen J.P., Cooney M., Parrott R.E., Sajaroff E.O., Win C.M., Keller M.D., Carpenter J.H.,

Carabana J., Krangel M.S., Sarzotti M., Zhong X.P., Wiest D.L. and Buckley R.H. 2007. T-B+NK+ severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood.* 109(8):3198-206.

Rodriguez-Gallego, C., Corell, A., Pacheco, A., Timon, M., Regueiro, J. R., Allende, L. M., Madrono, A., Arnaiz-Villena, A. 1996. Herpes virus saimiri transformation of T cells in CD3 γ immunodeficiency: phenotypic and functional characterization *J. Immunol. Methods* 198,177-186.

Rojo J.M., Ojeda G., Acosta Y.Y., Montes-Casado M., Criado G., Portoles P. 2014. Characteristics of TCR/CD3 complex CD3 chains of regulatory CD4 T (Treg) lymphocytes: role in Treg differentiation in vitro and impact on Treg in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 95:441-450.

Rosenstein Y., Park J. K., Hahn W.C., Rosen F.S., Bierer B.E., Burakoff S.J.. 1991. CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* 354:233-235.

Rowen L., Koop B.F. , Hood L.. 1996. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272:1755-62

S

Saito T., Weiss A., Gunter K.C., Shevach E.M., Germain R.N.. 1987. Cell surface T3 expression requires the presence of both alpha- and beta-chains of the T cell receptor. *J.Immunol.* 139:625-28

Sanal O., Yel L., Ersoy F., Tezcan I., Berkel A.I. 1996. Low expression of T-cell receptor-CD3 complex: a case with a clinical presentation resembling humoral immunodeficiency. *Turk. J. Pediatr.* 38(1): 81–84

Sanchez-Mateos P. and Sanchez-Madrid F.. 1991. Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. *Eur.J.Immunol.* 21:2317-2325.

San Jose, E., Sahuquillo A.G., Bragado R. and Alarcon B..1998. Assembly of the TCR/CD3 complex: CD3 epsilon/delta and CD3 epsilon/gamma dimers associate indistinctly with both TCR alpha and TCR beta chains. Evidence for a double TCR heterodimer model. *Eur.J.Immunol.* 28:12-21

Schamel W.W., Arechaga I., Risueño R.M., van Santen H.M., Cabezas P., Risco C., Valpuesta J.M., Alarcón B. 2005. Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J Exp Med.* 202(4):493-503.

Schamel W.W., Risueño R.M., Minguet S., Ortíz A.R., Alarcón B. 2006 A conformation- and avidity-based proofreading mechanism for the TCR-CD3 complex. *Trends Immunol.* 27(4):176-82.

Serrador J.M., Nieto M., Sanchez-Madrid F..1999.Cytoskeletal rearrangement during

migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol.* 9:228-233.

Shinkai Y., Ma A., Cheng H.L., Alt F.W.. 1995. CD3 epsilon and CD3 zeta cytoplasmic domains can independently generate signals for T cell development and function. *Immunity.* 2:401-411.

Shores E.W., Huang K., Tan T., Lee E., Grinberg A. Love P.E.. 1994. Role of TCR α chain in T cell development and selection. *Science* 266: 1047–50.

Siegers G.M., Swamy M., Fernández-Malavé E., Minguet S., Rathmann S., Guardo A.C., Pérez-Flores V., Regueiro J.R., Alarcón B., Fisch P., Schamel W.W.A. 2007. Different composition of the human and the mouse $\gamma\delta$ T cell receptor explains different phenotypes of CD3 γ and CD3 δ immunodeficiencies. *J. Exp. Med.* 204 (11):2537-44.

Soudais, C., de Villartay, J.P., Le Deist, F., Fischer, A., Lisowska-Grospierre, B. 1993. Independent mutations of the human CD3-epsilon gene resulting in a T cell receptor/CD3 complex immunodeficiency. *Nat. Genet.* 3(1):77–81.

Steele E.J., Rothenflu H.L., Ada G.L., Blanden R.V. 1993. Affinity maturation of lymphocyte receptors and positive selection of T cells in the thymus. *Immunol Rev.* 135:5-49

Strauss D.B., Weiss A. 1993. The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *J. Exp. Med.* 178:1523-1530.

Ströhlein MA, Siegel R, Jäger M, Lindhofer H, Jauch KW, Heiss MM. 2009. Induction of anti-tumor immunity by trifunctional antibodies in patients with peritoneal carcinomatosis. *J Exp Clin Cancer Res.* 14:28:18

Sussman J.J., Bonifacio J.S., Lippincott-Schwartz J., Weissman A.M., Saito T., Klausner R.D., Ashwell J.D.. 1988. Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell* 52:85-95.

Suzuki, T., Shin I.T., Kohara Y., Kasahara M. 2004. Transcriptome analysis of hagfish leukocytes: a framework for understanding the immune system of jawless fishes. *Dev. Comp. Immuno.* 28(10): 993-1003

Szymczak A.L., Workman C.J., Wang Y, Vignali K.M., Dilioglou S., Vanin E.F. Vignali D.A. 2004. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nature Biotechnology* 22:5 589-594.

T

Takada H., Nomura A., Roifman C.M., Hara T. 2005. Severe combined immunodeficiency caused by a splicing abnormality of the

Telerman A., Amson R.B., Romasco F., Wybran J., Galand P, Mosselmans R. 1987. Internalization of human T lymphocyte receptors. *Eur. J. Immunol.* 17:991-997.

Testi R., Phillips J.H., Lanier L.L.. 1989a. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol.* 143(4):1123-8.

Testi R., Phillips J.H., Lanier L.L. 1989b. Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C. *J Immunol.* 142(6):1854-60.

Thibault G., Bardos P. 1995. Compared TCR and CD3 epsilon expression on alpha beta and gamma delta T cells. Evidence for the association of two TCR heterodimers with three CD3 epsilon chains in the TCR/CD3 complex. *J. Immunol* 154:3814.

Thomassen E.A.J., Dekking E.H.A., Thompson A., Franken K.L., Sanal Ö., Abrahams J.P., van Tol M.J.D., Koning F.. 2006. The Impact of Single Amino Acid Substitutions in CD3 γ on the CD3 $\epsilon\gamma$ Interaction and T-Cell Receptor–CD3 Complex Formation. *Human Immunology* 67, 579–88

Tokgoz H., Caliskan U., Keles S., Reisli I., Guin I.S., Morgan N.V. 2013. Variable presentation of primary immune deficiency: two cases with CD3 gamma deficiency presenting with only autoimmunity. *Pediatr. Allergy Immunol.* 24(3):257–262.

Torres P.S., Alcover A., Zapata D.A., Arnaud J., Pacheco A., Martin-Fernandez J.M., Villasevil E.M., Sanal O. Regueiro J.R.. 2003. TCR dynamics in human mature T lymphocytes lacking CD3 gamma. *J.Immunol.* 170:5947-5955.

Tunncliffe A., Buluwela L., Rabbitts T.H. 1987. Physical linkage of three CD3 genes on human chromosome 11. *EMBO J.* 6:2953-57.

V

Valitutti S., Muller S., Cella M., Padovan E., Lanzavecchia. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375:148-151.

Valitutti S., Muller S., Salio M., Lanzavecchia A.. 1997. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J.Exp.Med.* 185:1859-1864.

van Oers N. S. C., Tohlen B., Malissen B., Moonaw C.R., Afendis S., Slaughter C.. 2000. The 21- and 23-kD forms of TCR are generated by specific ITAM phosphorylations. *Nat. Immunol.* 1: 322–328.

van Manen D., Gras L., Boeser-Nunnink BD, van Sighem AI, Maurer I, Mangas Ruiz MM, Harskamp AM, Steingrover R, Prins JM, de Wolf F, van't Wout AB, Schuitemaker H; Dutch HIV monitoring foundation HIV-1 Host Genetics study. 2011. Rising HIV-1 viral load set point at a population level coincides with a fading impact of host genetic factors on HIV-1 control. *AIDS.* 25(18):2217-26

van Tol, M.J.D., Sanal O., Yel L., et al., 1997. CD3 γ chain deficiency leading to a cellular immunodeficiency with mild clinical

Vogt A. B., S. Spindeldreher, Kropshofer H. 2002. Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains. *Immunol Rev* 189: 136-51

von Boehmer H., Kisielow P., Kishi H., Scott B., Borgulya P., Teh H.S. 1989. The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the alpha beta receptor for antigen. *Immunol Rev.* 109:143-51.

von Boehmer H. 1997. Aspects of lymphocyte developmental biology. *Immunol Today.* 18(6):260-2. Review.

von Essen M., Nielsen M.W., Bonefeld C.M., Boding L., Larsen J.M., Leitges M., Baier G., Odum N. and Geisler C. 2006. Protein kinase C (PKC) alpha and PKC theta are the major PKC isotypes involved in TCR down-regulation. *J.Immunol.* 176(12):7502-10

W

Wang B., Wang N., Salio M., Sharpe A., Allen D., She J. and Terhorst C.. 1998. Essential and partially overlapping role of CD3gamma and CD3delta for development of alphabeta and gammadelta T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 188:1375-1380

Wang Y., Becker D., Vass T., White J., Marrack P., Kappler J.W. 2009. A conserved CXXC motif in CD3epsilon is critical for T cell development and TCR signaling. *PLoS Biol.* 7(12):e1000253.

Waters, W.R., Palmer, M.V, Thacker T.C., Minion F.C., Davis W.C. 2006. Antigen-specific proliferation and activation of peripheral blood mononuclear cells from Mycobacterium bovis-infected reindeer. *Vet Immunol Immunopathol* 111(3-4): 263-77.

Weinberg K., Parkman R. 1990. Severe combined immunodeficiency due to a specific defect in the production of interleukin-2. *N Engl J Med.* 322:1718–23

Wegener, A.M., Letourneur F., Hoeveler A., Brocker T., Luton F., Malissen B. 1992. The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 68:83-95.

Wegener A.M., Hou X., Dietrich J. and C. Geisler .1995. Distinct domains of the CD3-gamma chain are involved in surface expression and function of the Tcell antigen receptor. *J.Biol.Chem.* 270:4675-4680.

Weiss A. 1990. Structure and function of the T cell antigen receptor. *J.Clin.Invest* 86:1015-22.

Weiss A., Littman D.R. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263-274

Weissman A. M., S. J. Frank, D. G. Orloff, M. Mercep, J. D. Ashwell, R. D. Klausner. 1989. Role of the zeta chain in the expression of the T cell antigen receptor: genetic reconstitution studies. *EMBO J.* 8:3651-56.

Wucherpfennig KW, Gagnon E, Call MJ, Huseby ES, Call ME. 2010 Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(4):a005140

Zanders E.D., Lamb J.R., Feldmann M., Green N. Beverley P.C. 1983. Tolerance of T-cell clones is associated with membrane antigen changes. *Nature* 303:625-627.

Zapata, D.A., Pacheco-Castro A., Torres P.S., Ramiro A.R., Jose E.S., Alarcon B., Alibaud L., Rubin B., Toribio M.L, Regueiro J.R..1999. Conformational and biochemical differences in the TCR.CD3 complex of CD8(+) versus CD4(+) mature lymphocytes revealed in the absence of CD3gamma. *J.Biol.Chem.* 274:35119-28

Zapata D.A., Schamel W.W., Torres P.S., Alarcon B., Rossi N.E. Navarro, M.N.,Toribio, M.L. Regueiro J.R. 2004. Biochemical differences in the alphabetaT cell receptor.CD3 surface complex betweenCD8+ and CD4+ human mature T lymphocytes. *J.Biol. Chem.* 279(23):24485–24492.

Zhu L., Chang M.M., Littman D.R. 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation.*Immunity* 30(5): 646-55

Zhu L., Paul W.E. 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells.*Cell Res.* 20(1):4-12

Y

Yang M., Omura S., Bonifacino J.S., and Weissman A.M.. 1998. Novel aspects of degradation of T cell receptor subunits from the endoplasmic reticulum (ER) in T cells: importance of oligosaccharide processing, ubiquitination, and proteasome-dependent removal from ER membranes. *J.Exp.Med.* 187:835-846.

Yang Y. and Wilson J.M.. 1996. CD40 ligand dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 273:1862-1864.

Z

Publicaciones relacionadas con la tesis

El complejo TCR/CD3: especificidad con flexibilidad

V. Pérez-Flores*, A.C. Guardo*, N.E. Rossi*, M.J. Recio, J. Reiné, J.R. Regueiro

Immunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

**Contribución equivalente.*

TCR/CD3 COMPLEX: SPECIFICITY WITH FLEXIBILITY

RESUMEN

En los últimos años se han publicado trabajos que modifican nuestra percepción de la estructura y la función del complejo TCR/CD3. Repasamos aquí su estequiometría, valencia, topología y variabilidad conformacional, así como los cambios que sufre tras encontrar a su antígeno y el papel específico de cada cadena CD3 en todo ello. El TCR/CD3 sorprende por su flexibilidad, que sin embargo no impide su exquisita especificidad.

PALABRAS CLAVE: TCR / Linfocito T / CD3 / Cambio conformacional / Glicosilación / Inmunodeficiencia.

ABSTRACT

In the last few years several publications have changed our perception of the structure and function of the TCR/CD3 complex. We review here its stoichiometry, valence, topology and conformational variability, together with the conformational changes that take place after ligand engagement, and the specific role of each CD3 chain in these features. Despite its surprising flexibility, the TCR/CD3 complex endows T cells with an exquisite specificity.

KEY WORDS: TCR / T lymphocyte / CD3 / Conformational change / Glycosylation / Immunodeficiency.

INTRODUCCIÓN

El receptor clonotípico de las células T (TCR) es un complejo formado por un heterodímero ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) responsable del reconocimiento antigénico, a menudo en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad (MHC), y una serie de cadenas invariantes de función y estequiometría aún inciertas: CD3 (γ , δ y ϵ) y CD247 (ζ). El TCR es crucial en dos momentos de la vida de los linfocitos T. Participa primero en la selección positiva y negativa del repertorio T durante la maduración tímica. Después, en la periferia, es responsable del reconocimiento de antígenos, y desencadena programas funcionales que expanden y diferencian a los clones relevantes en cada caso. Las cadenas invariantes tienen en ambos momentos un difícil papel: deben ser

capaces de acompañar primero hasta la membrana, y ayudar después a señalar con exquisita precisión, a heterodímeros $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ diversos cuya estructura exacta es por tanto impredecible en cada célula, algo que no sucede con ningún otro receptor de membrana salvo el BCR. De hecho las mutaciones *missense* que generan sitios ectópicos de glicosilación alteran gravemente la función de otros receptores más sencillos⁽¹⁾. Además, y de nuevo a diferencia de otros receptores, el TCR debe ser capaz de distinguir su escaso ligando entre miles de antígenos similares pero irrelevantes, y ello a pesar de su pobre afinidad. Varios artículos y revisiones recientes arrojan luz sobre aspectos estructurales y funcionales de este interesante complejo, algunos con importantes aplicaciones potenciales.

Differential Biological Role of CD3 Chains Revealed by Human Immunodeficiencies¹

María J. Recio,^{2*} Miguel Angel Moreno-Pelayo,^{2†} Sara S. Kiliç,^{2‡} Alberto C. Guardo,^{*} Ozden Sanal,[§] Luis M. Allende,[¶] Verónica Pérez-Flores,^{*} Angeles Mencía,[†] Silvia Modamio-Høybjør,[†] Elena Seoane,^{||} and José R. Regueiro^{3*}

The biological role in vivo of the homologous CD3 γ and δ invariant chains within the human TCR/CD3 complex is a matter of debate, as murine models do not recapitulate human immunodeficiencies. We have characterized, in a Turkish family, two new patients with complete CD3 γ deficiency and SCID symptoms and compared them with three CD3 γ -deficient individuals belonging to two families from Turkey and Spain. All tested patients shared similar immunological features such as a partial TCR/CD3 expression defect, mild $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytopenia, poor in vitro proliferative responses to Ags and mitogens at diagnosis, and very low TCR rearrangement excision circles and CD45RA⁺ $\alpha\beta$ T cells. However, intrafamilial and interfamilial clinical variability was observed in patients carrying the same CD3G mutations. Two reached the second or third decade in healthy conditions, whereas the other three showed lethal SCID features with enteropathy early in life. In contrast, all reported human complete CD3 δ (or CD3 ϵ) deficiencies are in infants with life-threatening SCID and very severe $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytopenia. Thus, the peripheral T lymphocyte pool was comparatively well preserved in human CD3 γ deficiencies despite poor thymus output or clinical outcome. We propose a CD3 δ \gg CD3 γ hierarchy for the relative impact of their absence on the signaling for T cell production in humans. *The Journal of Immunology*, 2007, 178: 2556–2564.

Mature $\alpha\beta$ T cells detect peptides on MHC molecules by way of a variable cell surface heterodimer termed the $\alpha\beta$ TCR (1). Before reaching the membrane, variable $\alpha\beta$ TCR heterodimers associate in a preferential sequence with three invariant dimers collectively called CD3 (CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$, and $\zeta\zeta$) (2). The stoichiometry of the full $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex is most likely $\alpha\beta/\delta\epsilon\gamma\epsilon\zeta\zeta$ (3). Once on the cell surface, CD3 proteins translate ligand recognition by $\alpha\beta$ TCR chains into intracellular signals that drive T cell maturation or apoptosis in the thymus, and T cell activation, proliferation, and effector function or anergy/apoptosis in the periphery (4). During early T cell development, some CD3 chains may act alone or assist immature TCR ensembles, such as those containing pre-TCR chains. CD3 chains lack intrinsic enzymatic activity for signal transduction. Rather, they relay on phosphorylation-dependent recruitment and the activation of a number of cytosolic and transmembrane protein ty-

rosine kinases and adaptors such as Zap-70, Fyn, Lck, TRIM, LAT, SLP76, and SIT (5). The intracellular substrates of each CD3 chain may be different, together with their respective signaling pathways (6).

The complete lack of any of the chains of the invariant dimers causes in humans a group of rare T lymphocyte immunodeficiencies that, in the case of δ and ϵ , partially resemble their murine models, i.e., severe selective $\alpha\beta$ T lymphocytopenia and absent $\alpha\beta$ TCR/CD3 surface expression, associated with SCID features and early lethality before 3 years of age (for a review, see Ref. 7). In contrast, CD3 γ deficiency was reported to allow in humans (8), but not in mice (6, 9), the selection of substantial numbers of polyclonal peripheral T cells that express relatively high levels of functional $\alpha\beta$ TCR/CD3 complexes (10, 11), albeit with an abnormal stoichiometry ($\alpha\beta/\delta\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$) and an impaired association to $\zeta\zeta$ dimers (11, 12). Two healthy, unrelated individuals lacking CD3 γ have been reported to reach their second and third decade, respectively, but the defect was lethal in a sibling with SCID symptoms (13). It is not clear why complete human CD3 γ deficiencies are clinically milder and phenotypically leakier for T lymphocyte numbers than in the murine model or complete human CD3 δ or ϵ deficiencies, and further cases can help to settle the matter.

In this study we have characterized the clinical, immunological, and genetic features of two new patients with complete CD3 γ deficiency, lethal SCID symptoms, and partial T lymphocytopenia and compare them with three previously reported cases and with other CD3 deficiencies. The results shed light on the relative role of each CD3 chain in TCR/CD3 expression and function in humans.

Materials and Methods

Case reports

A 7-mo-old boy (subject VI:1 of family 1; Fig. 1A), born in May 2004 to distantly consanguineous parents, suffered chronic diarrhea and pulmonary infections, recurrent otitis media, oral moniliasis, severe diaper dermatitis,

*Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain; [†]Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; [‡]Pediatric Immunology, Uludağ University Medical Faculty, Görükle-Bursa, Turkey; [§]Immunology Division, Hacettepe University Children's Hospital, Ankara, Turkey; [¶]Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; and ^{||}Inmunobiología Molecular, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain

Received for publication July 27, 2006. Accepted for publication November 28, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2005-01738/BMC), Fondo de Investigaciones Sanitarias (05/946), Ministerio de Ciencia y Tecnología (BMC2002-3247), Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0570/2004), and Mutua Madrileña. A.C.G. and V.P.-F. were supported by fellowships from the Universidad Complutense de Madrid and Ministerio de Educación y Ciencia, respectively.

² M.J.R., M.A.M.-P., and S.S.K. are joint first authors.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. José R. Regueiro, Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. E-mail address: regueiro@med.ucm.es

Copyright © 2007 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/07/\$2.00

Different composition of the human and the mouse $\gamma\delta$ T cell receptor explains different phenotypes of CD3 γ and CD3 δ immunodeficiencies

Gabrielle M. Siegers,¹ Mahima Swamy,¹ Edgar Fernández-Malavé,^{2,4} Susana Minguet,¹ Sylvia Rathmann,³ Alberto C. Guardo,⁴ Verónica Pérez-Flores,⁴ Jose R. Regueiro,⁴ Balbino Alarcón,² Paul Fisch,³ and Wolfgang W.A. Schamel¹

¹Max-Planck-Institute of Immunobiology and University of Freiburg, 79108 Freiburg, Germany

²Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

³Department of Pathology, University of Freiburg Medical Center, 79110 Freiburg, Germany

⁴Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

The $\gamma\delta$ T cell receptor for antigen (TCR) comprises the clonotypic TCR $\gamma\delta$, the CD3 (CD3 $\gamma\epsilon$ and/or CD3 $\delta\epsilon$), and the $\zeta\zeta$ dimers. $\gamma\delta$ T cells do not develop in CD3 γ -deficient mice, whereas human patients lacking CD3 γ have abundant peripheral blood $\gamma\delta$ T cells expressing high $\gamma\delta$ TCR levels. In an attempt to identify the molecular basis for these discordant phenotypes, we determined the stoichiometries of mouse and human $\gamma\delta$ TCRs using blue native polyacrylamide gel electrophoresis and anti-TCR-specific antibodies. The $\gamma\delta$ TCR isolated in digitonin from primary and cultured human $\gamma\delta$ T cells includes CD3 δ , with a TCR $\gamma\delta$ CD3 $\epsilon_2\delta\gamma\zeta_2$ stoichiometry. In CD3 γ -deficient patients, this may allow substitution of CD3 γ by the CD3 δ chain and thereby support $\gamma\delta$ T cell development. In contrast, the mouse $\gamma\delta$ TCR does not incorporate CD3 δ and has a TCR $\gamma\delta$ CD3 $\epsilon_2\gamma\zeta_2$ stoichiometry. CD3 γ -deficient mice exhibit a block in $\gamma\delta$ T cell development. A human, but not a mouse, CD3 δ transgene rescues $\gamma\delta$ T cell development in mice lacking both mouse CD3 δ and CD3 γ chains. This suggests important structural and/or functional differences between human and mouse CD3 δ chains during $\gamma\delta$ T cell development. Collectively, our results indicate that the different $\gamma\delta$ T cell phenotypes between CD3 γ -deficient humans and mice can be explained by differences in their $\gamma\delta$ TCR composition.

CORRESPONDENCE

Wolfgang Schamel:
schamel@immunbio.mpg.de

The $\gamma\delta$ TCR is a multimeric complex consisting of a clonotypic TCR $\gamma\delta$ heterodimer, the CD3 $\delta\epsilon$ and/or CD3 $\gamma\epsilon$ dimer, and the $\zeta\zeta$ dimer. Because $\gamma\delta$ TCR signaling regulates the commitment of double-negative (CD4⁻CD8⁻) cells to the $\gamma\delta$ T cell lineage and is required for their subsequent differentiation into mature $\gamma\delta$ T cells, the development of $\gamma\delta$ T cells depends on the expression of the $\gamma\delta$ TCR. Indeed, neither CD3 ϵ -nor CD3 γ -deficient mice have $\gamma\delta$ T cells (1–3). Although the overall structure and function of the $\gamma\delta$ TCRs in mice and humans are quite similar, ablation of the highly related CD3 γ and CD3 δ subunits has markedly different effects

in these two species. Hence, $\gamma\delta$ T cell development is severely impaired in CD3 γ -deficient mice but not in their human counterparts (3, 4). Conversely, CD3 δ deficiency results in a block in human, but not mouse, $\gamma\delta$ T cell development (5, 6).

In contrast to the $\gamma\delta$ TCR, the $\alpha\beta$ TCR has been studied extensively and its minimal stoichiometry is proposed to be TCR $\alpha\beta$ CD3 $\epsilon_2\delta\gamma\zeta_2$ in mice and humans (7, 8). Unlike the mouse $\alpha\beta$ TCR, mouse $\gamma\delta$ TCR does not incorporate CD3 δ even if this subunit is expressed intracellularly (9, 10), explaining why $\gamma\delta$ T cells develop normally in CD3 δ -deficient mice (6). Interestingly, the composition of the mouse $\gamma\delta$ TCR complex changes in activated cells: a differentially glycosylated form of CD3 γ becomes

G.M. Siegers and M. Swamy contributed equally to this article.
The online version of this article contains supplemental material.

Supplemental Material can be found at:
<http://jem.rupress.org/content/suppl/2007/10/08/jem.20070782.DC1.html>

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Human CD3 γ , but not CD3 δ , haploinsufficiency differentially impairs $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ surface TCR expression

Miguel Muñoz-Ruiz^{1,2†}, Verónica Pérez-Flores^{1†}, Beatriz Garcillán^{1,2}, Alberto C Guardo¹, Marina S Mazariegos^{1,2}, Hidetoshi Takada³, Luis M Allende⁴, Sara S Kilic⁵, Ozden Sana⁶, Chaim M Roifman⁷, Eduardo López-Granados⁸, María J Recio^{1,2}, Eduardo Martínez-Naves¹, Edgar Fernández-Malavé^{1,2} and José R Regueiro^{1,2*}

Abstract

Background: The T cell antigen receptors (TCR) of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes are believed to assemble in a similar fashion in humans. Firstly, $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ TCR chains incorporate a CD3 $\delta\epsilon$ dimer, then a CD3 $\gamma\epsilon$ dimer and finally a $\zeta\zeta$ homodimer, resulting in TCR complexes with the same CD3 dimer stoichiometry. Partial reduction in the expression of the highly homologous CD3 γ and CD3 δ proteins would thus be expected to have a similar impact in the assembly and surface expression of both TCR isotypes. To test this hypothesis, we compared the surface TCR expression of primary $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells from healthy donors carrying a single null or leaky mutation in *CD3G* ($\gamma^{+/-}$) or *CD3D* ($\delta^{+/-}$, $\delta^{+/\text{leaky}}$) with that of normal controls.

Results: Although the partial reduction in the intracellular availability of CD3 γ or CD3 δ proteins was comparable as a consequence of the mutations, surface TCR expression measured with anti-CD3 ϵ antibodies was significantly more decreased in $\gamma\delta$ than in $\alpha\beta$ T lymphocytes in CD3 $\gamma^{+/-}$ individuals, whereas CD3 $\delta^{+/-}$ and CD3 $\delta^{+/\text{leaky}}$ donors showed a similar decrease of surface TCR in both T cell lineages. Therefore, surface $\gamma\delta$ TCR expression was more dependent on available CD3 γ than surface $\alpha\beta$ TCR expression.

Conclusions: The results support the existence of differential structural constraints in the two human TCR isotypes regarding the incorporation of CD3 $\gamma\epsilon$ and CD3 $\delta\epsilon$ dimers, as revealed by their discordant surface expression behaviour when confronted with reduced amounts of CD3 γ , but not of the homologous CD3 δ chain. A modified version of the prevailing TCR assembly model is proposed to accommodate these new data.

Keywords: T cells, CD3, Haploinsufficiency

Background

The human T cell antigen receptors (TCR) of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes are believed to assemble in a similar fashion [1]. First, variable $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ heterodimers bind to invariant CD3 $\delta\epsilon$ heterodimers, then to CD3 $\gamma\epsilon$ heterodimers and finally to CD247 (or TCR ζ) homodimers, resulting in surface TCR complexes with equal amounts of the two different, albeit highly homologous, CD3 heterodimers. In contrast, mouse $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR differ

drastically in their stoichiometry, since the $\gamma\delta$ TCR does not incorporate any CD3 $\delta\epsilon$ dimers but, rather, two CD3 $\gamma\epsilon$ dimers [2]. This finding begs the question as to whether the human variable $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ chains show identical affinity for both CD3 heterodimers.

We reasoned that, if both the $\alpha\beta$ and the $\gamma\delta$ TCR isotypes use identical amounts of CD3 $\gamma\epsilon$ and CD3 $\delta\epsilon$, then decreased availability of CD3 γ or CD3 δ proteins, as observed in heterozygous carriers of mutations in *CD3* genes [3], would be expected to have a similar impact on the assembly and surface expression of both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR isotypes. To test this hypothesis, we compared TCR surface levels of primary $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells from healthy haploinsufficient donors carrying null or leaky

* Correspondence: regueiro@med.ucm.es

†Equal contributors

¹Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain

²12 de Octubre Institute of Health Research, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Curriculum Vitae

**EUROPEAN
CURRICULUM VITAE
FORMAT**



PERSONAL INFORMATION

Name	PÉREZ FLORES, VERÓNICA
Address	RONDA DEL GUINARDÓ 29, 1º2ª 08024 BARCELONA
Telephone	617663683
Fax	
E-mail	perezfloresv@gmail.com
Nationality	spanish
Date of birth	[06,01,1981]

WORK EXPERIENCE

- | | |
|--|--|
| • Dates (from – to) | June 2013-Actually |
| • Name and address of employer | Advanced Accelerator Applications |
| • Type of business or sector | Radiopharmaceutical company |
| • Occupation or position held | Sales Rep. |
| • Main activities and responsibilities | In charge of sales over east Spanish area, in particular <ul style="list-style-type: none">- Introducing a new PRRL treatment for neuroendocrine tumors.- Introducing other new radiopharma products- Writing up public tenders- Dealing direct with hospitals managing and involved doctors- Managing and participating in main local and international congresses in Nuclear Medicine and Oncology |
| • Dates (from – to) | January 2012-June 2013 |
| • Name and address of employer | Nucliber SA |
| • Type of business or sector | Medical and pharmaceutical distributor |
| • Occupation or position held | Product specialist. |
| • Main activities and responsibilities | Activities: <ul style="list-style-type: none">- <i>Introducing in Spain a multidisciplinary treatment in liver cancer in nuclear medicine, interventional radiology and oncology</i>- Writing up public tenders- Dealing direct with hospitals managing and involved doctors- <i>Dealing with international supplier</i>- Managing and participating in main local and international congresses in Nuclear Medicine and Interventional Radiology |
| • Dates (from – to) | March 2010-January 2012 |
| • Name and address of employer | Nucliber SA |
| • Type of business or sector | Medical and pharmaceutical distributor |
| • Occupation or position held | Biotechnology sales Rep. |

• Main activities and responsibilities

Activities:

- *Introducing in Spain different products of cellular and molecular biology and proteomics.*
- *Writing up public tenders*
- *Dealing direct with hospitals, universities and research centers*
- *Dealing with international suppliers.*

EDUCATION AND TRAINING

<ul style="list-style-type: none"> • Dates (from – to) • Name and type of organisation providing education and training • Principal subjects/occupational skills covered • Title of qualification awarded 	<p>March 2004-april 2010</p> <p>Universidad Complutense. Facultad de Medicina Immunology Area (Microbiología I Departament)</p> <p>Capacity of research, solve problems and look for solutions. Capacity of writing scientific articles in english and present/discuss data in international communities.(4 articles published, more than 20 congresses communications)</p> <p>PhD</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Dates (from – to) • Name and type of organisation providing education and training • Principal subjects/occupational skills covered • Title of qualification awarded • Level in national classification (if appropriate) 	<p>October 2007-June 2008</p> <p>Universidad Complutense. Facultad de Educación</p> <p>Teaching methods and strategies. Pedagogic approaches. Oral Communications skills.</p> <p><i>Pedagogical Aptitude Certificate – Curso de adaptacion pedagógica (CAP)</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> • Dates (from – to) • Name and type of organisation providing education and training • Principal subjects/occupational skills covered • Title of qualification awarded • Level in national classification (if appropriate) 	<p>September 2002- October 2004</p> <p>Universidad Complutense. Facultad de Biología</p> <p>First approach to the researching field and scientific communications. (3 articles published).</p> <p>Bsc with honor in Biology. Genetics – Licenciada con grado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid (Tesina)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Dates (from – to) • Name and type of organisation providing education and training • Principal subjects/occupational skills covered • Title of qualification awarded • Level in national classification (if appropriate) 	<p>September 1999-June 2004</p> <p>Universidad Complutense. Facultad de Biología</p> <p>Biological knowledges of new technologies in medical and biotechnologies fields. Genetics speciality</p> <p>Bsc in Biology. Genetics – Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid</p>

**PERSONAL SKILLS
AND COMPETENCES**

*Acquired in the course of life and career
but not necessarily covered by formal
certificates and diplomas.*

MOTHER TONGUE **[spanish]**

OTHER LANGUAGES

ENGLISH

- | | |
|------------------|------|
| • Reading skills | GOOD |
| • Writing skills | GOOD |
| • Verbal skills | GOOD |

FRENCH

- | | |
|------------------|------|
| • Reading skills | GOOD |
| • Writing skills | GOOD |
| • Verbal skills | GOOD |

CATALAN

- | | |
|------------------|------|
| • Reading skills | GOOD |
| • Writing skills | GOOD |
| • Verbal skills | GOOD |